UNIVERSITE DE LAUSANNE FACULTE DES SCIENCES

INSTITUT SUISSE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR LE CANCER

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'ADN LIE A LA MEMBRANE NUCLEAIRE

THESE

présentée à la faculté des Sciences de l'Université pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

JEROME HUMBERT
licencié ès sciences

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0065

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM Dr. Ronald HANCOCK, directeur de thèse, Prof. Bernhard HIRT, rapporteur et Prof. Georges BRUNISHOLZ, président du jury

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. Jérôme HUMBERT, licencié ès sciences naturelles (diplôme d'Etat)

intitulée "ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'ADN LIE A LA MEMBRANE CELLULAIRE"

Lausanne, le 18 juillet 1975

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Prof. Georges BRUNISHOLZ, vice-doyen

UNIV. LEIDEN BIBL.

Cette thèse a été réalisée dans le Département de Biologie Cellulaire de l'Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur le Cancer, sous la direction du Docteur Ronald Hancock, chercheur établi, et grâce à l'appui du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (crédit 3.358.70 ; 3.080.73).

Je veux tout d'abord vivement remercier le Docteur Ronald Hancock qui a assumé la direction de ce travail avec beaucoup de compétence; sa clarté d'esprit et l'étendue de sa culture m'ont été d'un précieux concours. Je lui suis aussi particulièrement reconnaissant de m'avoir donné l'occasion de participer à de nombreux cours et réunions scientifiques.

Je remercie également Monsieur le Professeur Henri Isliker, directeur de l'ISREC, ainsi que le Docteur Nicolas Odartchenko, Privat-docent, directeur du Département de Biologie Cellulaire, pour leur hospitalité dans cet Institut.

Ma gratitude s'adresse également à Monsieur le Professeur Bernhard Hirt qui a accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Les conseils qu'il m'a donné tout au long de ce travail m'ont beaucoup aidé.

Tous mes remerciements vont ensuite au Docteur Stan Fakan et à sa femme Jitka qui m'ont initié à la microscopie électronique. Leur collaboration dans une partie de ce travail a été très appréciée.

Le Docteur Alain Gautier, directeur du Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Lausanne est aussi remercié pour m'avoir donné accès à ses appareils.

J'adresse enfin mes remerciements à ma femme Antoinette ainsi qu'à tous ceux qui de loin ou de près m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME 1

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS 2

INTRODUCTION 4

Le chromosome eucaryote et la membrane nucléaire 8

1 Aspects morphologiques 8

2 Aspects biochimiques 9

3 Fonction de la membrane nucléaire 11

MATERIEL ET METHODES 13

1 Tampons et solutions 13

2 Culture des cellules 13

3 Synchronisation des CHO 14

4 Isolement et purification des noyaux 15

5 Isolement de la membrane nucléaire 16

6 Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide 15 % 19

7 Analyse de la teneur en bases d'ADN 20

8 Isolement et purification des ADN 21

9 Colonne d'hydroxylapatite 24

10 Microscopie électronique 26

ANNEXE 28

1 Problèmes relatifs à l'étude de la renaturation de l'ADN 28

1.1 Marquage in vivo 28

1.1.1 ADN total 28

1.1.2 M-ADN 28

1.2 Cisaillement des ADN 29

1.3 Préparation des ADN 29

1.4 Colonnes d'hydroxylapatite 30

1.5 Stabilité physico-chimique de l'ADN 32

1.6 Problèmes sur la iodination de l'ADN in vitro 34

1.6.1 Marquage de l'ADN à ^{125}I et purification de l'ADN iodiné 34

1.6.2 Cinétique de renaturation de ^{125}I T-ADN avec ^{3}H T-ADN en excès 36

2 Problèmes relatifs à l'analyse de la teneur en bases de M-ADN 38

RESULTATS 40

1 Morphologie de la cellule P 815 40

2 Isolement et propriétés des noyaux 40

2.1 Isolement, rendement 40

2.2 Morphologie 44

2.3 Marquage de la membrane nucléaire 44

3 Isolement de la membrane nucléaire 52

4 Propriétés de la membrane nucléaire 57

4.1 Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide contenant du SDS 57

4.2 Densité de flottaison de la membrane nucléaire 61

5 Détachement de l'ADN isolé avec la membrane nucléaire 64

5.1 DNAase I 64

5.2 Traitement de la membrane nucléaire dans des solutions de NaCl 66

5.3 Traitement de la membrane nucléaire dans l'urée ou la formamide 71

5.4 Traitement de la membrane par du détergent ou de la pronase 73

6 Propriétés de M-ADN 75

6.1 Propriétés physico-chimiques 75

6.1.1 Gradient de CsCl 75

6.1.2 Détection d'ADN monocaténaire 75

6.1.3 Analyse de la teneur en bases de l'ADN par électrophorèse sur couche mince 78

6.1.4 Cinétique de renaturation 79

6.2 Propriétés spécifiques de M-ADN 83

6.2.1 Evidence pour la spécificité topologique de M-ADN 83

6.2.2 ADN synthétisé tardivement dans la période S 83

DISCUSSION 87

1 Techniques d'isolement du complexe ADN-m.n. 87

2 Propriétés de la membrane nucléaire 87

3 Détachement de l'ADN de la membrane nucléaire 90

4 Enrichissement en séquences répétitives de M-ADN 92

5 Présence d'ADN monocaténaire dans la membrane nucléaire 94

6 Evidence pour la spécificité de l'ADN lié à la membrane nucléaire 94

CONCLUSION 97

REFERENCES 99

RESUME

Nous avons étudié biochimiquement et morphologiquement le complexe ADN-membrane nucléaire en utilisant deux lignées différentes de cellules cultivées in vitro : cellules de mastocytome de souris de la lignée P 815, et cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO).

Nous avons développé des méthodes permettant d'isoler et de purifier les noyaux de ces deux lignées de cellules. Ces méthodes évitent l'usage de détergent non ionique ou ionique. Le niveau de contamination cytoplasmique dans les deux types de noyaux a été contrôlé au ME. Il apparaît comme étant très faible. La présence en particulier de mitochondries n'a jamais été observée.

La m.n. a été marquée à la choline radioactive et l'ADN à la thymidine radioactive. Le complexe ADN chromosomique-m.n. a été isolé par deux méthodes qui évitent une fragmentation excessive de la m.n.. L'état de la m.n. après isolement a été contrôlé au ME.

Après un premier isolement, le complexe contient encore 1-5 % de l'ADN nucléaire total. Des expériences de compétition nous ont montré que l'ADN extrait est topologiquement spécifique de la m.n.. Chez des CHO maintenues en culture synchrone par sélection mitotique, l'ADN lié à la m.n. n'est pas synthétisé préférentiellement en fin de phase S.

Afin de clarifier le type de liaison impliqué entre l'ADN et la m.n. nous avons étudié le détachement de l'ADN isolé avec la m.n. (= M-ADN) au moyen de plusieurs lavages, de détergents, d'enzyme, de milieux de forces ioniques élevées et d'agents dénaturants.

La teneur en bases de M-ADN a été analysée par électrophorèse sur couche mince ou par gradient de CsCl. La présence d'ADN monocaténaire dans M-ADN a été testée par la nucléase S1. Enfin, l'organisation interne de M-ADN a été étudiée par cinétique de renaturation et fractionnement sur HAP.

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

ADN	: acide déoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
c.f.	: concentration finale
CT-ADN	: calf thymus ADN. ADN de thymus de veau.
Ci	: Curie
DOC	: déoxycholate de sodium
d	: dalton
dTMP	: thymidine 5'phosphate
dAMP	: déoxyadénosine 5'phosphate
dGMP	: déoxyguanosine 5'phosphate
dCMP	: déoxycytidine 5'phosphate
dNMP	: déoxynucléoside 5'phosphate
EDTA	: éthylène-diamine-tétraacétate
HAP	: hydroxylapatite
K	: kilo (10^3)
m.	: membrane
m.n.	: membrane nucléaire
ME	: microscope électronique
µ	: micro (10^{-6})
M-ADN	: membrane ADN. ADN restant attaché à la membrane nucléaire lors de l'isolement de celle-ci.
NM-ADN	: non membrane ADN. NM-ADN = T-ADN - M-ADN.
n	: nano (10^{-9})
PB	: phosphate buffer. Tampon phosphate.
PM	: poids moléculaire
rpm	: révolution par minute
ρ	: masse spécifique (m/v). A la place de "masse spécifique" nous utiliserons le terme "densité". Ce mot provient du mot density très utilisé.
SDS	: dodécylsulfate de sodium
T-ADN	: total ADN. ADN contenu dans la totalité du noyau.
TEMED	: N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

TdR : thymidine

tris : tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

INTRODUCTION

En 1963, Jacob et al. ont proposé un modèle simple et précis assurant à la fois la régulation de la duplication du chromosome et la distribution des deux chromosomes répliqués dans les deux cellules filles chez les bactéries. Ce modèle résulte de l'existence d'une connection entre la surface bactérienne et le chromosome. L'initiateur d'un cycle de réplication du chromosome joue le rôle d'intermédiaire entre la membrane et le chromosome; une réaction de la surface active le système de réplication d'ADN et la duplication commence jusqu'à l'obtention de deux chromosomes. La fin du processus de réplication active la séparation de la surface cellulaire entre les deux sites d'attachement des chromosomes, permettant ainsi la ségrégation des chromosomes. A un stade ultérieur, une des réactions ayant lieu au niveau de la surface bactérienne peut donner le signal pour un nouveau cycle de réplication. En résumé, l'idée de base émergeant de cette communication, dérivant du modèle du réplicon, est que tous les éléments génétiques cellulaires sont attachés d'une manière ou d'une autre à certains sites spécifiques de la surface cellulaire, permettant ainsi un contrôle de la réplication et la ségrégation du chromosome.

Depuis la publication de ce modèle, beaucoup d'études sur l'attachement des chromosomes bactériens et phagiques à la membrane bactérienne ont été publiées. Ces études visent à répondre à plusieurs questions: 1) existe-t-il un attachement de l'ADN à la membrane et quel est sa nature 2) l'appareil réplicatif du chromosome est-il lié à la m. 3) quel est le rôle de la membrane dans la ségrégation des chromosomes 4) existe-t-il aussi une liaison entre ADN viral et membrane bactérienne.

Dans la plupart des études biochimiques, le terme de membrane est défini opérationnellement, après analyse de la vitesse de sédimentation d'un lysat cellulaire, comme étant une structure ayant une constante de sédimentation plus élevée que le reste du lysat. Plusieurs études ont

montré que des lipides marqués avec des précurseurs radioactifs co-sédimentaient avec cette structure. Ainsi, il faut considérer le terme de membrane comme étant synonyme de ces structures.

Attachement du chromosome bactérien à la membrane

Le contact étroit de l'ADN cellulaire à la membrane est bien établi à la suite d'études morphologiques menées spécialement sur des bactéries gram-positives comme Bacillus subtilis (Ryter et Jacob, 1963) et sur des sphéroplastes de bactéries gram-négatives comme E.Coli (Ryter, 1968). Le noyau diffus bactérien est attaché à des invaginations de la membrane appelées mésosomes; cette association persiste tout au long de la division cellulaire. Delius et Worcel (1974), en utilisant la technique d'étalement de Kleinschmidt, ont aussi montré au ME l'existence d'un attachement du chromosome d'E.Coli à la membrane après lyse des bactéries dans un détergent non ionique en présence de 1.0 M NaCl. Des études biochimiques faisant intervenir différentes techniques de séparation de la membrane suggèrent l'existence d'une relation entre l'ADN et un ou plusieurs sites d'attachement sur la membrane. Earhart et al. (1968) et Tremblay et al. (1969) travaillant sur B. megaterium ont utilisé un complexe entre le détergent ionique Sarkosyl et le cation Mg^{++} pour adsorber la membrane. Après isolement de la membrane dans des gradients de saccharose, ils concluent à la présence d'ADN lié à la membrane. Burrel et al. (1971), en étudiant la reformation d'un complexe ADN-membrane après irradiation au rayons X de Micrococcus radiodurans proposent plusieurs sites d'attachement du chromosome à la membrane; de même, Strätling et Knippers (1971) sur E.Coli pol A^- ainsi que Rosenberg et Cavalieri (1968) sur E.Coli. Par des études de digestion à la DNAase 1, Strätling et Knippers (1971) ont montré que l'ADN lié à la membrane de E.Coli n'est pas cryptique. De plus, après traitements du complexe aux détergents tels que Triton X-100, DOC, Sarkosyl, les mêmes auteurs concluent que l'ADN est lié à des structures protéiques plutôt que lipidiques. Alors qu'on pourrait penser que l'ADN est lié à la membrane par l'intermédiaire d'une ADN

polymérase, Fuchs et Hanawalt (1970), Strätling et Knippers (1971) montrent qu'il est possible d'obtenir, soit par sonication soit par traitement avec un détergent non ionique tel que Triton X-100, un complexe ADN-membrane dépourvu d'activité ADN polymérasique.

Réplication du chromosome bactérien

Sueoka et Quinn (1968), Yamaguchi et al. (1971), Ganesan et Lederberg (1965) montrent que chez B. subtilis le point de réplication est lié à la membrane. Chez E.Coli on trouve aussi des évidences pour un semblable attachement: Smith et Hanawalt (1967), Parker et Glaser (1974).

Concernant l'origine de la réplication sur le chromosome, plusieurs travaux suggèrent qu'elle est liée à la membrane de B. subtilis (Sueoka et Quinn, 1968; Yamaguchi et al., 1971) et de E.Coli (Parker et Glaser, 1974; Fielding et Fox, 1970). Yamaguchi et al. (1971) proposent de considérer le point de réplication et l'origine de réplication sur le chromosome comme deux entités séparées et indépendantes, l'une se rattachant à la membrane plasmatique, l'autre à des structures mésosomiques de la paroi.

25% de l'activité DNA polymérasique totale de B. subtilis est liée à la membrane (Ganesan et Lederberg, 1965). Sur E.Coli, les connaissances sont plus avancées du fait de la découverte de mutants pol A^- déficients en activité pol 1 (De Lucia et Cairns, 1969; Gross et Gross, 1969). Ces mutants ont une activité polymérasique liée à la membrane (Smith et al., 1970; Knippers, 1970; Knippers et Strätling, 1970). Cependant des résultats plus récents toujours sur E.Coli ont montré que 1) cette activité n'est pas vraiment liée à la membrane mais qu'elle se situe plutôt sur certaines sections périphériques du chromosome (Strätling et Knippers, 1971) 2) une activité plus importante encore se trouve être non liée à la membrane (Kornberg et Gefter, 1971; Kornberg et Gefter, 1970; Gefter et al., 1971; Nüsslein et al., 1971; Reddy et al. 1971; Schaller et al., 1972).

Une relation directe entre la membrane bactérienne et la réplication du chromosome a été établie. Une altération dans la structure protéique de la membrane (Siccardi et al., 1971; Shapiro et al., 1970), une déficience dans la croissance de la membrane (Glaser et al., 1973; Marvin, 1968) peuvent entraîner un défaut de réplication du chromosome.

Ségrégation du matériel génétique bactérien

Plusieurs expériences montrent que la ségrégation des chromosomes dans la bactérie se fait par attachement à la membrane. Ryter (1968) ainsi que Sueoka et Quinn (1968) ont montré qu'une partie du chromosome était lié d'une façon permanente à la membrane.

Attachement de l'ADN viral à la membrane bactérienne

Il a été suggéré dans le cas du phage ØX 174 qu'après infection, le génôme, sous forme d'ADN monocaténaire est transformé en forme réplicative RF 1 (ADN bicaténaire sans ouverture) qui s'associe à un site préexistant dans la membrane cellulaire (Sinsheimer et al., 1968). Ce complexe a été isolé par Loos et al. (1971). Ces auteursont montré que l'ADN viral pouvait être libéré du complexe par détergent ionique; l'usage de détergent non ionique dissocie la membrane mais ne libère pas l'ADN, qui reste attaché à des fragments membranaires. La liaison de l'ADN du phage λ à la membrane cellulaire après infection a été étudiée par Sakaki et al. (1971). Il ressort que dans ce cas l'attachement est spécifique et requiert une portion de la moitié droite du chromosome.

Au vu de l'importance de la membrane dans les phénomènes physiologiques bactériens (ségrégation du matériel lors de la division ou de la conjugaison bactérienne, contrôle de la réplication du chromosome), certains investigateurs ont envisagé la possibilité que la m.n. chez les organismes eucaryotes pouvait remplir un rôle similaire. Un nombre impressionnant de publications sont apparues dès lors, attribuant à la m.n. un rôle d'élément de contrôle dans la réplication, l'orientation,

la ségrégation des chromosomes. Par les pages qui suivent, nous allons brièvement présenter la situation chez les eucaryotes, en abordant les aspects morphologiques, biochimiques et fonctionnels de la m.n..

Le chromosome eucaryote et la membrane nucléaire

1 Aspects morphologiques

Membrane nucléaire (m.n.)

La m.n. est une structure caractéristique des systèmes eucaryotes. Elle divise la cellule en deux compartiments, le nucléoplasme qui contient le génôme et le cytoplasme qui contient les organelles et l'appareil de synthèse des protéines. Cette séparation disparaît seulement d'une manière transitoire lors de la mitose, dès la prométaphase jusqu'à la télophase. Cependant, on peut se demander si la séparation nucléoplasme-cytoplasme par une enveloppe nucléaire est un élément nécessaire à la survie de la cellule, car des travaux montrent que chez certains types cellulaires très différenciés le génôme n'est pas entouré par la m.n., par exemple chez des coccides (Moses et Wilson, 1970). L'enveloppe nucléaire est un système à double membrane qui comprend un espace intracisternal de largeur variable comprise entre 100 Å à 600 Å. L'épaisseur de chaque membrane varie entre 70 et 120 Å (mesures faites au ME sur des coupes cryo-décapées : Kartenbeck et al., 1971). A certains endroits, les membranes externes et internes se rejoignent formant les pores nucléaires. La structure détaillée du pore a été étudiée par Franke (1974).

Chromatine périphérique condensée

Beaucoup de types de noyaux sont caractérisés par la présence de chromatine très condensée à la périphérie du noyau. Cette chromatine forme des amas continus interrompus seulement par des canaux intranucléaires (Watson, 1955). Cette zone ne contient pas seulement une

grande quantité d'ADN par μm^3 mais elle contient aussi la majeure partie de l'ADN nucléaire total. Dans des hépatocytes de souris, Kiefer et al. (1971) ont montré par cytophotométrie que plus de 50% de l'ADN total se trouve dans une zone comprise entre la membrane nucléaire et une ligne située à 1 µm vers l'intérieur de celle-ci.

Les évidences morphologiques sur la spécificité de l'association de la chromatine à la m.n. existent dans le sens que certaines structures chromosomiques bien définies y sont reconnaissables: par exemple le chromosome hétérochromatique X chez l'humain femelle (appelé aussi corpuscule de Barr) forme un objet dense situé à proximité de la m.n. (Yunis, 1965).

2 Aspects biochimiques

Constituants de la m.n.

Les membranes de la cellule sont constituées principalement par des protéines et des lipides. Comparée à la fraction microsomale chez le rat ou le porc, la m.n. se caractérise dans les deux systèmes par une teneur relativement faible en lipide. Les lipides non polaires tels que les stérols font spécialement défaut. Le rapport phospholipides/protéines (poids/poids) dans tous les cas est plus petit que 0.4. Les phospholipides sont les plus représentés parmi les lipides de la m.n.. Dans le foie de rat, Franke et al. (1970) trouvent des phospholipides dans 85% de la masse totale des lipides de la m.n.. La lécithine et la phosphatidyléthanolamine sont les phospholipides dominants et représentent plus des 75% de tous les phospholipides contenus dans la m.n., ceci dans tous les systèmes étudiés (Lemarchal et Bornens, 1969; Kleinig et al., 1971). Comme dans toutes les membranes cellulaires, les lipoprotéines de la membrane nucléaire peuvent être solubilisées en présence de détergent ionique ou non ionique.: Barton et al. (1971), Aaronson et Blobel (1974) peuvent enlever la membrane interne et externe du noyau en utilisant le détergent non ionique Triton X-100. Il semble aussi (Lemarchal et Bornens, 1969) que la présence d'agent chélateur peut destabiliser la m.n.. Des analyses des protéines de m.n.

sur gel de polyacrylamide ont été faites par Deumling et Franke (1972), Monneron et al. (1972). Cependant, aucune des protéines n'a encore été identifiée. Il semble clair à la suite de plusieurs publications que la m.n. ne contient pas constitutivement d'ADN polymérase (Deumling et Franke, 1972; Kay et al., 1971).

Similairement aux procaryotes, on trouve chez les eucaryotes de l'ADN lié à la m.n. dans presque tous les systèmes étudiés (Zbarsky et al., 1969; Jackson et al., 1968; Ormerod et Lehmann, 1971; Franke et al., 1973; Kay et al., 1972; Agutter, 1972; Bornens, 1973). (Il existe des exceptions, par exemple Kashnig et Kasper (1969) qui sur du foie de rat, trouvent 0.0% d'ADN lié à la m.n.). Cet attachement semble très solide, puisque les techniques utilisées par les auteurs ci-dessus impliquent l'utilisation de forces de cisaillement par sonication (Jackson, Zbarsky), de concentrations salines élevées et de détergent (Ormerod), d'agents destabilisant les liaisons hydrogènes tels que l'urée et de DNAase 1 (Franke). Dans ce dernier cas, la résistance d'une partie de l'ADN lié à la m.n. à la DNAase 1 peut indiquer que cet ADN est partiellement cryptique: une partie peut être prise dans la masse membranaire et être ainsi inaccessible à la DNAase 1 tandis que le reste non protégé est accessible à l'enzyme.

Concernant la localisation des sites d'attachement de l'ADN à la membrane nucléaire, les avis divergent. Comings et Okada (1970a), Engelhardt et Pusa (1972) pensent que les chromosomes sont attachés à des sites localisés vers les pores nucléaires. Franke et al. (1973), par contre, considèrent que la chromatine est attachée exclusivement dans les régions interporiques et que le matériel lié au pore est plutôt des ribonucléoprotéines.

Il existe de multiples évidences biochimiques qui démontrent que l'ADN lié à la m.n. est spécifique: Rae et Franke (1972) ont montré par hybridation in situ que l'hétérochromatine à proximité de la membrane nucléaire était enrichie en séquences répétitives. De même, Franke et al. (1973) ont trouvé que l'ADN lié à la membrane présentait par rapport à l'ADN total un enrichissement de 1.4 fois en séquences répétitives.

3 Fonction de la m.n.

Ségrégation du contenu nucléaire

Il est raisonnable de penser que, similairement à la membrane bactérienne, la membrane nucléaire des systèmes eucaryotes joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. En fait, c'est bien le cas chez certains eucaryotes primitifs ou mésocaryotes comme les dinoflagellés où les chromosomes sont attachés d'une manière permanente à la m.n. par ce qui pourrait être le centromère. Dans cet organisme, la membrane nucléaire reste intacte durant la mitose. La division du noyau se fait par des faisceaux de microtubules provenant de l'extérieur du noyau (Kubai et Ris, 1969). Dans les organismes à formes ouvertes de mitose et de méïose (désagrégation de la m.n.), on remarque souvent de petits fragments membranaires toujours attachés aux chromosomes lors de la métaphase (Comings et Okada, 1970b).

Réplication de l'ADN

Bon nombre d'investigateurs ont cherché à établir un parallèle entre les modèles de réplication du chromosome proposés pour les bactéries et la situation chez les eucaryotes. On a cherché en particulier à déterminer 1) si la m.n. interne est le lieu de réplication de l'ADN 2) si seulement l'initiation de la réplication a lieu à la membrane nucléaire. Des évidences en faveur de ces idées proviennent de travaux de Hanaoka et Yamada (1971), Pearson et Hanawalt (1971), Allin et Montagnier (1973), Mizuno et al. (1971a), Mizuno et al. (1971b) et Comings et Kakefuda (1968). Cependant actuellement il est clair que l'interprétation des expériences réalisées par ces auteurs n'est pas correcte. Oppenheim et Wahrman (1973), Edenberg et Huberman (1975), Kuroiwa (1973, 1974), Wise et Prescott (1973), Fakan et al. (1972) ont étudié la localisation et la nature de l'ADN nouvellement synthétisé dans différents systèmes. Fakan et Hancock (1974) en particulier ont montré par autoradiographie que des cellules en croissance

exponentielle marquées brièvement avec ^{3}H TdR (20 - 30 sec) synthétisent l'ADN dans tout le noyau. Les sites sont cependant plus concentrés à la périphérie, reflétant probablement une concentration plus élevée d'ADN dans ces régions (Kiefer et al. 1971).

Certains travaux ont été publiés sur la relation entre la m.n. et la réplication du génôme viral. Green (1972), Pearson et Hanawalt (1971) par des techniques indirectes, proposent que la réplication de l'ADN des virus Polyome et Adeno a lieu en relation avec la membrane nucléaire, mais ces résultats ne sont plus acceptés. Une démonstration directe que la réplication de l'ADN d'Adeno 12 n'a pas lieu à la membrane nucléaire a été publiée par Shiroki et al. (1974). Ces auteurs ont étudié la réplication de l'ADN du virus Adeno 12 sur des cellules embryonnaires de rein humain par la technique indirecte dite " M-Band " et par la technique directe de l'autoradiographie. Ils ont montré que l'ADN viral nouvellement synthétisé est présent dans le complexe Sarkosyl-Mg-m.n. alors que les autoradiographies n'indiquent pas de synthèse en relation avec la m.n.. Ces résultats mettent ainsi en évidence la difficulté d'interprétation des résultats obtenus avec la technique dite " M-Band ". Ce travail est confirmé par Simmons et al.(1974) qui ne montre aucune évidence pour une réplication du génôme de l'adénovirus en rapport avec la membrane nucléaire.

MATERIEL ET METHODES

1. Tampons et solutions

TKM : 10 mM tris, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4 (4^o)
TM : 10 mM tris, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4
TNaMEx : 10 mM tris, 0.5 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 7.4
TNaM : 10 mM tris, 0.5 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4
TMEx : 10 mM tris, 0.5 M $MgCl_2$, pH 7.4
F : 0.2 mM EDTA pH 7.0

2. Culture des cellules

Mastocytes

Il s'agit de cellules provenant d'un mastocytome développé chez la souris et dont le caractère typique de mastocyte a été établi par Dunn et Potter (1957). La technique de culture in vitro a été mise au point par Schindler et al.(1959). Le milieu de culture est de l'Eagle (Eagle 1959) contenant 10 % de sérum de veau (CS). On utilise comme récipient des bouteilles en plastique(Becton, Dickinson et Co, USA) ou des ballons en verre allant jusqu'à 10 litres de capacité. Le temps de doublement des cellules est d'environ 10 heures. Les cellules en suspension dans le milieu sont maintenues en culture par dilution tous les deux jours dans du milieu frais. La concentration saturante est de 15 à 20 x 10^5 cellules/ml. La phase logarithmique de croissance se situe entre les concentrations de 1 et 8 x 10^5 cel./ml. Les cellules sont comptées au moyen d'un haemacytomètre. Les conditions de marquage des cellules in vivo sont décrites dans l'annexe.

Cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO)

Les cellules de la lignée CHO (Tjio et Puck 1958 ; Tobey et al. 1967) nous ont été fournies par le Prof. W.C.Dewey, Fort Collins, Colorado. Les cellules ont un temps de doublement de 14 heures. Elles sont cul-

tivées à 37° C, soit dans des bouteilles en plastique soit dans des bouteilles en Pyrex " Blake " (Belco) dans du milieu Mc Coy's 5A (Gibco) contenant 10 % de CS et 5 % de sérum foetal de veau (FS) ainsi que les antibiotiques suivants : sulfate de néomycine 0.1 g/l, polymixine B 0.05 g/l, sel potassique de pénicilline G 0.05 g/l, sulfate de streptomycine 0.05 g/l (Dewey et Miller 1969). Les cellules poussent en couche unicellulaire. La croissance s'arrête lorsqu'elles arrivent à confluence. Le transfert des cellules se fait comme suit : le milieu de culture est aspiré au moyen d'une pipette Pasteur. Les cellules sont lavées 2 fois avec une solution de trypsine 0.2 % plus 5 % CS. Les cellules ainsi lavées sont laissées 2 à 5 min. à température ambiante. Le détachement des cellules est contrôlé au microscope. Lorsque le détachement est suffisant, on ajoute du milieu de resuspension (Mc Coy's 5A + 5 % FS + 1.6 % CS). Les cellules sont resuspendues vigoureusement avec une pipette. Elles sont comptées au moyen d'un compteur Coulter. Un nombre de cellules adéquat est alors transféré dans une nouvelle bouteille contenant du milieu frais. La culture se fait dans un incubateur dont l'atmosphère est saturée en H_2O et contenant 5 % de CO_2.

3. Synchronisation des CHO

La technique suivie est celle mise au point par Nagasawa et Dewey (1972). La veille de la synchronisation, les cellules sont plantées dans des bouteilles de 1 litre " Blake" contenant 60 ml de milieu conditionné (= milieu déjà utilisé, refiltré) Mc Coy's 5A à raison de 1.5×10^7 cellules/bouteille. Les bouteilles sont ensuite agitées légèrement dans la chambre chaude (37°) pendant une demi-heure environ de façon à obtenir une distribution uniforme des cellules sur la surface puis, lorsqu'elles se sont attachées, elles sont mises dans l'incubateur. Lors de la sélection des cellules mitotiques, les bouteilles sont disposées sur l'agitateur mécanique et agitées à 228 cycles/min. pendant 20 à 30" ; les cellules mortes sont ainsi détachées. Le milieu résultant de cette première agitation est récupéré pour une prochaine

utilisation après filtration. 20 ml de milieu frais à 37° est ajouté dans chaque bouteille au moyen d'une pipette mécanique. Les bouteilles sont à nouveau agitées pendant 20 à 30". On récolte les cellules dans un récipient maintenu à 0° dans de la glace fondante. La plupart des cellules récoltées sont arrêtées au stade de la métaphase par inactivation du fuseau (Nagasawa et Dewey 1972). 20 ml de milieu sont ajoutés dans les bouteilles et on laisse incuber 10 min. jusqu'à la prochaine récolte. Après chaque récolte, le nombre de cellules mitotiques détachées, et le niveau éventuel de contamination par des cellules non mitotiques sont mesurés au moyen d'un compteur Coulter. Après la récolte d'un nombre suffisant de cellules mitotiques, les cellules sont centrifugées à 800 g pendant 7 min. à 4° et rassemblées. La quantité et la pureté des cellules sont à nouveau analysées. Les cellules peuvent être stockées à 0° pendant quelques heures ($\leq$ 3 heures) et, au moment voulu, elles sont plantées comme déjà décrit. La synchronisation est bonne pendant le premier cycle.

4. Isolement et purification des noyaux

Cellules P 815

Toutes les opérations se font à froid. Les cellules en culture sont concentrées par centrifugation, lavées dans du TKM-0.25 M saccharose, centrifugées et reprises à une concentration de 2 - 7 x 10^7 cel./ml dans du TKM. On les laisse gonfler pendant 5 min. Elles sont passées ensuite dans un homogénéisateur Dounce en acier inox spécialement conçu pour cet usage, dont le jeu est de 15 µm. Une quinzaine de coups (aller et retour) sont généralement nécessaires pour obtenir 80 % de noyaux propres (contrôle par microscopie optique, au contraste de phase). En augmentant le nombre de coups, on risque d'endommager les noyaux. Les noyaux sont ensuite concentrés et lavés dans du TKM-0.25 M saccharose. L'étape finale de la purification des noyaux est basée sur celle décrite par Blobel et Potter (1966). Les noyaux sont repris dans a volumes de TKM-0.4 M saccharose ; cette solution est versée dans

2.06 a volumes de TKM-2.3 M saccharose et mixée manuellement ; on a ainsi une solution TKM-1.68 M saccharose. Dans le cas de petites préparations, 4 ml de cette solution sont couchés sur un coussin de 1 ml consistant en TKM-2.3 M saccharose (ρ = 1.30 g/cm^3). On centrifuge à 100 000 g pendant 30 min. dans un rotor SW 65 (Beckman, Spinco). Dans le cas de grandes préparations, (1 à 6 x 10^9 noyaux), le volume final de la couche supérieure est de 15 ml, le coussin de 20 ml, et on centrifuge dans un rotor SW 27 pendant 90 min à 100 000 g. Le surnageant est jeté avec l'interface qui contient des débris cytoplasmiques ainsi que des noyaux contaminés. Les parois sont nettoyées avec un papier humide. Le culot représente une fraction très pure de noyaux ainsi qu'on peut en juger au M.E. (voir résultats). Le culot est repris dans du glycérol 87 % avec une spatule, passé à l'agitateur rotatif, puis stocké à -20^o. Le stockage prolongé à - 20^o dans du glycérol ne semble pas affecter la morphologie des noyaux ainsi que l'on peut en juger au microscope à contraste de phase.

Cellules CHO

Les cellules sont centrifugées, lavées dans TKM-0.25 M saccharose, puis reprises dans TM. On les laisse gonfler pendant 5 min. Elles sont versées dans un homogénéisateur Dounce inox avec un jeu de 20 µm ; on applique environ 30 coups puis les noyaux sont concentrés et repris dans TKM et repassés dans le Dounce (30 nouveaux coups). La qualité des noyaux est contrôlée au microscope à contraste de phase. Les étapes suivantes sont les mêmes que dans le cas des P 815, à l'exception que la concentration de saccharose du coussin est abaissée à 2.15 M (ρ = 1.28 g/cm^3). Au M.E., les noyaux apparaissent comme tout-à-fait satisfaisants (voir résultats). Le tableau A résume les différentes étapes de l'isolement et de la purification.

5. Isolement de la membrane nucléaire (m.n.)

Méthode à la DNAase 1

Les noyaux purifiés sont repris et lysés dans un tube en polyallomer

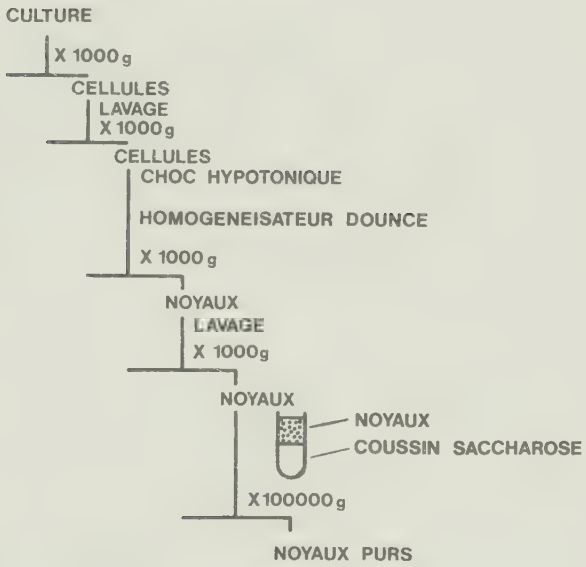


TABLEAU A

Schéma décrivant les différentes étapes de l'isolement et de la purification des noyaux de P 815 et CHO.

par agitation rotative (10" à moyenne vitesse) dans 0.5 ml de TNaMEx. Il y a formation d'un gel. 10 µg de DNAase 1 pancréatique (Sigma) sont ajoutés (6 µg/ml/1 x 10^7 noyaux). On incube à 37^o pendant 10 min.. Le pourcentage d'ADN global qui reste attaché à la membrane nucléaire varie très peu si l'on incube plus longtemps. On inhibe la réaction en ajoutant 50 µl d'une solution de citrate 0.5 M et en refroidissant à 4^o . Le lysat est ensuite mis sur une couche de 1.5 ml de TNaM (ρ = 1.13 g/cm^3), elle-même supportée par une couche de 1.5 ml de TNaM (ρ = 1.24 g/cm^3). Le tout est centrifugé à 100 000 g pendant 60 min.. Le matériel membranaire qui se trouve à l'interface " 1.24 - 1.13" est récolté soit en perçant la paroi du tube au moyen d'une seryngue et d'une aiguille hypodermique, soit en perçant le bas du tube et en collectant des fractions.

Méthode au Mg^{++}

La méthode est basée sur la technique publiée par Monneron et al. (1972). Avant utilisation, les noyaux stockés à - 20^o sont repris dans TKM-0.25 M saccharose au moyen d'un homogénéisateur. Une aliquote est utilisée pour le comptage sur un haemacytomètre. Le reste est centrifugé. Le culot résultant est d'abord repris dans quelques gouttes de glycérol par agitation rotative. Dans le cas de petites préparations, les noyaux (1 x 10^7) sont repris dans 0.7 ml de TMEx (ρ = 1.27 g/cm^3) dans un tube SW 65. Le tout est passé à l'agitateur rotatif à pleine vitesse pendant 3 x 30" avec refroidissement après chaque période de 30". On obtient un homogénat encore légèrement visqueux et mousseux. On ajoute alors 1 µl de 1-octanol comme agent tensio-actif, on passe brièvement à l'agitateur rotatif et on centrifuge à 1000 g pendant 5 min.. On ajoute ensuite sur cette solution 2.8 ml de TMEx (ρ = 1.22 g/cm^3), puis 1.5 ml de TMEx (ρ = 1.16 g/cm^3). L'homogénat est centrifugé à 200 000 g pendant 2 heures à 4^o dans un rotor SW 65 ou SW 50.1. La m.n. est récupérée à l'interface " 1.22 - 1.16" soit par prélèvement direct au moyen d'une seryngue soit par collection de fractions. Dans le cas de préparations importantes, nous avons repris les noyaux dans 5 ml TMEx (tube pour rotor SW 27, nitrate de cellulose). Les

volumes des étages supérieurs sont de 20 et 10 ml (de bas en haut). L'homogénat est centrifugé à 100 000 g pendant la nuit.

6 Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide 15 %

Le gel de polyacrylamide est formé par la polymérisation du monomère acrylamide (CH_2=CH-$CONH_2$) en présence d'une petite quantité d'agent bifonctionnel (cross-linker) N,N' méthylènebisacrylamide (BIS ; CH_2=CH-CONH-CH_2-HNCO-CH=CH_2). Lorsque la polymérisation a lieu dans H_2O, on a formation d'un réseau tridimentionnel qui offre une résistance au passage des macromolécules. Les groupes amide donnent au gel son caractère hydrophile. La présence du détergent anionique dodécylsulfate de sodium (SDS) est destinée à solubiliser le matériel à analyser (Maizel, 1971). Cet agent est capable de dissocier une grande variété de complexes protéiques. Non seulement les interractions protéine-protéine sont éliminées par le SDS mais aussi les interractions protéine-acide nucléique ainsi que protéine-lipide. Le mécanisme de dénaturation se fait comme suit : les groupes sulfate négatifs des molécules de SDS se lient aux groupes amine positifs de la protéine. Par leur résidu aliphatique, les molécules de SDS se lient à un résidu aliphatique d'une autre molécule de SDS dont le groupe sulfate est libre. On a ainsi une protéine entourée par des charges négatives, et du fait de la répulsion électrostatique de ces charges entre elles, la protéine se dénature. La migration dans le gel se fait en fonction du PM de la protéine.

La technique utilisée est basée sur celle décrite par Laemmli et Favre (1973). Il s'agit de gels de 2 mm d'épaisseur, format 13.3 x 10.5 cm, coulés entre deux plaques de verre. La zone supérieure du gel (5 mm environ) contient 5 % de polyacrylamide (gel de concentration = " stacking gel"). La zone inférieure contient 15 % de polyacrylamide (gel de migration = "running gel"). Les 2 gels sont préparés séparément : on mélange d'abord pour le stacking gel 1.67 ml de 30 % acrylamide (Serva), 2.6 ml de 1 % BIS (Serva), 1.25 ml de 1.0 M tris pH 6.8,

4.4 ml H_2O. Pour le running gel : 15 ml de 30 % acrylamide, 2.6 ml de 1 % BIS, 8.1 ml de 1.5 M tris pH 8.7 et 4.2 ml H_2O. La solution qui donnera le running gel est dégazée. Le gel est ensuite polymérisé chimiquement par adjonction de 0.01 ml de TEMED (Serva) et de 0.1 ml de persulfate d'ammonium 10 % fraîchement préparé. On ajoute aussi à ce moment-là 0.15 ml de SDS 20 %. La solution est versée entre les deux plaques de verre. On ajoute un peu d'H_2O avec précaution sur cette solution de façon à obtenir une surface plane après polymérisation. La polymérisation dure environ 30'. Pendant ce temps la solution qui donnera le stacking gel est dégazée à son tour. On y ajoute 0.005 ml de TEMED, 0.050 ml de persulfate d'ammonium 10 % et 0.050 ml de SDS 20 %. La fine couche d'eau est enlevée au papier buvard. On verse la solution de stacking gel sur la solution polymérisée de running gel et on y introduit un râteau qui créera dans cette solution des loges où les échantillons pourront être déposés. La quantité de protéine par échantillon a été déterminée par la méthode de Kuno et Kihara (1967). L'électrophorèse est réalisée avec un courant de 30 mA pendant 3 heures à 3 heures et demie, à température ambiante. Le gel est coloré dans une solution de bleu de Coomassie pendant 2 heures, puis décoloré pendant la nuit. Les profils d'absorption ont été réalisés avec un spectrophotomètre Zeiss M 4 Q III réglé sur 570 nm et couplé à un enregistreur (W+W electronic recorder 2211).

7 Analyse de la teneur en bases d'ADN

Une molécule dans un fluide soumise à un champ électrique E se meut avec une vitesse V = EQ/K où Q est la charge nette sur la molécule et K une constante dépendant de la grandeur et de la forme de la molécule et des effets retardants d'autres ions dans la solution ; K augmente avec l'augmentation de la force ionique du tampon et diminue avec l'augmentation de la température. Les mobilités des molécules ayant une forme et une grandeur similaires, par exemple les monodéoxynucléotides, dépendent principalement de leur charge nette dans un tampon donné. Les groupes ionisables sur les déoxynucléotides sont le phosphate primaire (pK = 0.7-1.6), le phosphate secondaire (pK $\cong$ 6), les

groupes aminés sur dCMP, dAMP, dGMP (pK = 2 - 4.5) et les groupes énols sur dGMP, TMP (pK = 9-10). Entre pH 2 et 5 les dNMP ont des charges négatives comprises entre 0 et 1, selon le degré d'ionisation du groupe NH_2 (Smith 1967). Les 4 principaux déoxyribonucléotides sont séparés sur la base de la valeur de leur pK(NH_2) à pH 3.6.

Avant utilisation, les préparations de M-ADN et de NM-ADN marqués au ^{32}P sont stockées à -20° dans 10 mM tris pH 8.6.

Hydrolyse de l'ADN en 5' mononucléotides : la technique est basée sur celle de Shatkin (1969) avec les modifications suivantes : 1) le temps d'incubation à la DNAase 1 et de la phosphodiestérase de venin de serpent (Boehringer) a été porté à 18 heures. 2) nous n'avons pas ajouté de tampon acétate de pyridine-EDTA à la fin de la réaction 3) nous avons ajouté à l'hydrolysat 30 µl d'une solution aqueuse contenant 1.25 mg/ml de chaque marqueur (TMP, dCMP, dGMP, dAMP ; Sigma,USA).

Séparation des 5' mononucléotides sur couche mince : l'électrophorèse a été faite sur des plaques de cellulose non modifiée de 20 x 20 cm (Camag), d'après la technique de Hiby et Kröger (1967). 60-70 µl de la solution hydrolysée ont été déposés en couches successives sur une ligne près de la cathode. Après séchage de la tache au foehn, la plaque a été humidifiée par vaporisation du tampon 0.05 M formate de sodium. La plaque a été soumise à un courant de 20 mA pendant 1 heure 30 sur un appareil réfrigéré à l'eau. Les nucléotides séparés ont été repérés aux U.V. puis grattés et comptés dans un compteur à scintillation en présence de toluène/PPO/POPOP et de Cab-O-Sil M-5 (Cabot Co, Boston, Mass.) comme mélange thixotropique (40 g/l).

8 Isolement et purification des ADN

Préparation pour l'étude de la cinétique de renaturation

^3H T-ADN : la méthode est basée sur celle de Sharp et al. (1974). Les cellules en culture sont concentrées par centrifugation. Le culot est lavé dans TKM-0.25 M saccharose puis les cellules sont centrifugées à nouveau. Le culot est repris dans 8 volumes d'EDTA 0.1 M - tris 0.01 M

pH 7.4. On ajoute une solution de 20 % de SDS à une concentration finale de 0.5 %. La solution tourne au gel. Le gel est sonifié pendant environ 5 x 3" à la position 5 sur un appareil émetteur d'ultrasons (Branson Sonifier). On obtient ainsi une solution moins visqueuse. La solution est centrifugée brièvement de façon à enlever les bulles d'air prises dedans. De la pronase (20 mg/ml dans 0.01 M tris 0.01 M EDTA pH 7.2), prédigérée pendant 2 heures à 37^{o} est ajoutée à une c.f. de 1 mg/ml. La solution est incubée pendant 4 heures à 37^{o}. On ajoute NaCl 5 M à une c.f. de 0.1 M. On extrait ensuite les acides nucléiques une fois avec 1 volume égal d'une solution de phénol saturée avec 0.1 M tris pH 7.4, par agitation rotative pendant 3 min. La solution est centrifugée à 1800 g pendant 5 min. à température ambiante. La phase supérieure aqueuse est prélevée puis réextraite avec un même volume de $CHCl_3$: alcool isoamylique (24 : 1). Après centrifugation, on ajoute 2 volumes d'EtOH 100 % froid à la phase supérieure aqueuse pour précipiter les acides nucléiques. La solution alcoolique est mise à -20^{o} pendant 2 heures au moins. Le précipité est récupéré par centrifugation ; il est séché sous vide. L'hydrolyse de l'ARN se fait par adjonction de 0.3 N NaOH (2 x le volume du culot cellulaire initial). On incube pendant 6 heures à 37^{o}. On ajoute ensuite 2 volumes de 0.05 M tris pH 7.4 et on neutralise par adjonction de HCl 3 N. L'ADN est précipité avec 2 volumes d'EtOH froid comme plus haut. Après centrifugation du précipité, le culot est séché sous vide et repris dans 10 mM PB pH 6.8 par léger chauffage ($\leqslant 45^{o}$). La solution est dialysée contre 10 mM PB - 1 mM EDTA pH 6.8. Après dialyse, l'ADN est distribué dans des tubes puis stocké à -20^{o}, après congélation rapide dans CO_2/EtOH.

^{32}P M-ADN : le complexe ADN-m.n. est isolé d'après la méthode au Mg^{++} dans des tubes pour rotor SW 27. Après dilution du matériel dans TMEx, il est centrifugé à travers un coussin de 3 ml de TMEx-saccharose (ρ = 1.13 g/cm^3): 24 Krpm/90'/4^{o}/SW 27/tube polyal.. Le culot est traité comme pour T-ADN jusqu'à la $2^{ème}$ extraction au $CHCl_3$-alcool isoamylique, inclue. A ce moment-là, la phase aqueuse est dialysée contre

F. On ajoute ensuite NaOH 2 N (c.f. 0.3 M) et on chauffe à 100° (bain-marie) pendant 20'. L' ADN est cisaillé en fragments de 7.1 S et l'ARN est complètement hydrolysé (99 % de l'ARN soluble dans du TCA). La solution est ensuite neutralisée puis dialysée contre F et lyophilisée. Il s'est avéré que cette préparation contenait encore beaucoup de radioactivité soluble. La préparation a donc été purifiée par sédimentation sur gradient alcalin de saccharose (5 %-20 % de saccharose, 0.9 M NaCl, 0.1M NaOH, 1 mM EDTA ; 45 K rpm/14h./20°/ SW 65/tube nitrate de cellul.). La radioactivité a été mesurée par effet Cerenkov. L'ADN a été poolé, neutralisé, dialysé contre F, lyophilisé et enfin repris dans 10 mM PB-1 mM EDTA pH 6.9. M-ADN a été stocké à -20° après congélation rapide dans CO_2/EtOH.

Préparation pour les gradients de CsCl et l'analyse de la teneur en bases.

^{32}P NM-ADN : NM-ADN provient de la partie inférieure du tube lors de l'isolement du complexe ADN-m.n. par la technique au Mg^{++}. Il représente l'ADN de la chromatine qui n'est pas en relation avec la membrane. Le contenu de la partie inférieure du tube est dialysé contre 10 mM tris pH 7.4 puis précipité dans 2 volumes d'alcool en présence de 0.1 M NaCl. Le précipité est récolté par centrifugation à 12 000 g à 4° pendant 30'. Le culot est séché sous vide puis repris dans 10 mM tris pH 7.4. 0.2 M EDTA pH 7.0 sont ajoutés (c.f. 10 mM). Suit un traitement à la RNAase (Fluka, 5 x cristallisée ; 100 µg/ml) pendant 1 heure à 37° (97 % de l'ARN hydrolysé). Puis SDS est ajouté (c.f. 0.6 %). On laisse 30 min. à température ambiante. Enfin on traite à la pronase prédigérée (100 µg/ml) 2-3 heures à 37°. NaCl 5 M est ajouté (c.f. 1 M) et on laisse précipiter pendant 20 min. à 4°. Le précipité est centrifugé à 2500 g à 4° pendant 20 min.. Cette étape enlève la plupart des protéines restant en solution. Le surnageant est extrait 2 fois au $CHCl_3$-alcool isoamylique (24:1). Après évaporation sous vide, une partie de la phase aqueuse est ensuite dialysée contre 10 mM tris pH 7.4 à 4°. Cette solution traitée une nouvelle fois à la RNAase est le point de départ pour l'étude de l'ADN sur gradient de CsCl. Pour

les analyses de la teneur en bases de l'ADN, une autre partie a été dialysée contre H_2O, hydrolysée avec KOH 0.3 N pendant 15 heures à 37^o, neutralisée avec NaH_2PO_4 3 M, précipitée avec EtOH. Le culot, après centrifugation, a été repris dans 10 mM tris pH 8.6 et stocké à -20^o.

^{32}P M-ADN : le complexe ADN-m.n. est obtenu par la méthode au Mg^{++}, récolté avec une seryngue puis dilué et centrifugé sur un coussin de TMEx-saccharose (ρ = 1.13 g/cm^3) : 25 K rpm/90'/4^o/SW 27/tube polyal.. Le complexe est repris dans 10 mM tris pH 7.4. On y ajoute 30 µg/ml d' ADN de thymus de veau. L'extraction se poursuit comme pour NM-ADN.

9 Colonnes d'HAP

Le fractionnement de l'ADN a été fait dans un bac en polycarbonate où il a été possible de mettre 17 colonnes d'HAP maintenues à 60^o. Les colonnes consistent en seryngue de polypropylène de 10 ml (Becton, Dickinson & Co) munie d'aiguille 20 G 1½ (même fabricant). Les aiguilles traversent verticalement un bouchon de caoutchouc, évitant ainsi à l'eau du bac de s'échapper. On collecte les fractions par l'orifice de l'aiguille. On dispose au fond de la seryngue un disque de papier (Whatman GF/C 2.4 cm Balston Ltd) de 1.8 - 1.9 cm de diamètre. 1-2 ml d'HAP (Bio-Rad) traitée à 100^o au préalable dans 0.12 M PB pH 6.8 pendant 20' sont déposés au moyen d'une pipette dans la colonne. Un morceau de silicone piqué à l'orifice de l'aiguille sert de bouchon. La colonne est ensuite lavée avec 2 x 3 ml de 0.12 M PB-0.4 % SDS ; il faut souvent remuer l'HAP pour prévenir les effets de canaux (channel effects). Les expériences de cinétiques de renaturation ont été réalisées à différentes concentrations de Na^+. Les températures de renaturation (Tm-25^o ; Marmur et Doty 1961 ; Wetmur et Davidson 1968), ont été déduites de la formule :

$$Tm = 16.6 \log (Na^+) + 0.41 \times \% GC + 81.5$$

où (Na^+) représente la concentration du ion Na^+ dans la solution de renaturation. Les valeurs des Cot ont été calculées d'après l'équation de Britten et Kohne (1968) :

Cot (moles de nucléotidesxsecxlitre^{-1})=(µg ADN/ml)(SCF)(hrs)/83 où SCF représente le facteur de correction dû au sel, pris comme égal à 1.00 pour 0.12 M PB à la température de Tm-25^{o} (Britten et Smith 1970). Les renaturations ont été réalisées soit (pour les grands volumes) dans des tubes fermés avec une couche de paraffine sur le liquide pour éviter l'évaporation de H_2O, soit (pour les petits volumes) dans des tubes en verre provenant de pipette pasteur, scellés à la flamme aux deux extrémités. La fin de la réaction a été déterminée soit en diluant des aliquotes dans 2.5 ml 0.12 M PB à 4^{o} soit en plongeant pendant 2 à 3" les tubes en verre scellés dans de la glace fondante puis en les congelant immédiatement dans CO_2/EtOH. Les échantillons sont stockés à -20^{o}. Lors du fractionnement, tous les échantillons sont ramenés à 0^{o}, les tubes scellés ouverts et les échantillons dilués dans 2.5 ml 0.12 M PB à 0^{o}.

Fractionnement sur HAP

Elution de l'ADN monocaténaire : les échantillons sont préchauffés à 60^{o} puis versés sans tarder dans les colonnes. On remue HAP au moyen d'un ustensile adéquat puis on collecte dans un récipient. On lave 3 fois avec 2.5 ml 0.12 M PB équilibré à 60^{o} en remuant de temps en temps l'HAP.

Elution de l'ADN bicaténaire : les récipients sont changés et on élue avec 2.5 ml de 0.4 M PB à 60^{o}. On lave encore 3 fois avec 2.5 ml de 0.4 M PB. A chaque récipient, 100 µg de CT ADN sont ajoutés comme "carrier". On précipite ensuite à 4^{o} tout l'ADN présent avec TCA 50 % (c.f.10 %). Après 20' à 4^{o}, les échantillons sont passés sur des filtres GF/B, puis les filtres sont séchés aux IR. Les filtres sont placés dans les flacons à compter avec un mélange scintillant composé de toluène de PPO et de POPOP. La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation.

10. Microscopie électronique (en collaboration avec Fakan et Wallace)

Coupes : le matériel biologique (cellules, noyaux, membrane nucléaire) est lavé dans du Sörensen (0.1 M NaH_2PO_4 - 0.1 M Na_2HPO_4 pH 7.4) puis fixé dans une solution Sörensen-glutaraldéhyde 1.6 % pendant 1 heure à 4^o ; l'échantillon est ensuite lavé dans du Sörensen puis post-fixé dans OsO_4 2 % pendant 1 heure à température ambiante sous la hotte. Il est ensuite deshydraté dans EtOH ou dans de l'acétone selon les étapes suivantes : 50 %, 2 x 1', 75 % 2 x 5', 90 % 2 x 15', 100 % 3 x 20'. La solution acétone 100 % est conservée dans du $CuSO_4$ et est filtrée juste avant emploi. Lorsque la deshydratation est terminée, la matériel est imprégné d'une solution d'Epon-acétone 100 % 1 : 1, pendant 30' puis d'Epon pur pendant 3 heures à 37^o ou pendant 16 heures à 22^o. Le matériel est placé ensuite dans des capsules de gélatine en présence d'Epon et il est mis à polymériser à 60^o pendant 24 heures environ. Avant de couper le matériel, on taille d'abord des pyramides dans le bloc durci de façon à présenter le matériel biologique favorablement à la coupe. Les coupes se font au moyen d'un microtome Reichert avec un couteau en verre dont l'angle d'attaque est de 5^o environ. Les coupes doivent être de couleur grise ($\cong$ 300 Å). Elles sont repêchées sur des grilles. La coloration des coupes se fait d'abord à l'acétate d'uranyle 5 % pendant 20' puis, après lavage à H_2O distillée, au citrate de Pb pendant 10'. Après un nouveau rinçage à H_2O les coupes sont prêtes à être observées. L'observation et les photos ont été faites au moyen d'un Zeiss EM 9A ou d'un Philips EM 300.

Etalement de la membrane nucléaire : une fraction de l'échantillon est déposée sur H_2O distillée ; le matériel flottant est repêché au moyen d'une grille carbonnée recouverte de formvar. La préparation est colorée positivement à l'acétate d'uranyle 2 % pendant 2', puis deshydratée dans des solutions d'EtOH 70 %, 95 %, 100 % (1' par étape) et enfin trempée dans le solvant acétate amylique pendant 2 x 10'. Les grilles peuvent être observées directement après.

Coloration négative : une goutte de suspension de membrane nucléaire est déposée au moyen d'une pipette pasteur sur une grille recouverte

de formvar seulement. On laisse sédimenter le matériel sur la grille. Le liquide est retiré à l'aide d'un buvard. On peut refaire l'opération si l'on estime que la quantité de matériel sédimenté est insuffisante. Une fois la grille séchée, on colore la préparation négativement en ajoutant sur la grille une goutte d'une solution d'acétate d'uranyle ou de phosphotungstate de sodium (PTA) 1.5 % pendant 10 à 30". La solution de coloration est absorbée au moyen d'un buvard. La préparation peut être observée immédiatement après.

ANNEXE

1. Problèmes relatifs à l'étude de la renaturation de l'ADN

1.1 Marquage in vivo

1.1.1. ADN total

Des expériences préliminaires visant à optimaliser les conditions de marquage à la ^{3}H TdR nous ont conduit aux observations suivantes :

a) ^{3}H TdR abaisse le niveau de saturation de croissance des cellules P 815 : 0.018 µCi/ml de ^{3}H TdR (57.7 Ci/mmol.,NEN Chemicals) dans un milieu Eagle + 10 % CS sans adjonction de TdR non marquée abaisse de 35 % environ le niveau de saturation des P 815. TdR non marquée en présence de ^{3}H TdR tend à renverser la situation.

b) il y a environ 0.8 µg/ml de TdR non marquée dans le milieu, ceci dû à la présence de 10 % de CS non dialysé.

c) pour pouvoir quadrupler (2 cycles cellulaires), des cellules à une concentration initiale de 1 x 10^{5} cell./ml utilisent 0.5 µg de TdR par ml de milieu pour la synthèse de leur ADN.

En tenant compte de ces résultats, nous avons choisi de marquer les cellules avec 1 µCi/ml de ^{3}H TdR et en l'absence de TdR non marquée. Dans ce cas, nous notons un abaissement de 50 % du niveau de saturation de croissance des cellules. De cette façon nous obtenons une activité spécifique de 4000 cpm/µg d'ADN total ce qui est suffisant pour les expériences de renaturation.

1.1.2. M-ADN

Devant l'échec de renaturation d'ADN marqué in vitro avec ^{125}I (voir plus loin), nous avons finalement marqué les cellules avec du ^{32}P (Amersham) à une concentration de 2.5 µCi/ml. De façon à obtenir une activité spécifique assez élevée (20 000 cpm/µg d'ADN), nous avons marqué les cellules dans du milieu Eagle contenant 1/10 de la concen-

tration normale de phosphate plus 10 % de CS non dialysé (soit 1/7 du taux normal de phosphate).

1.2. Cisaillement des ADN

La technique d'extraction et de purification de l'ADN (Sharp et al. 1974) prescrit l'utilisation de NaOH pour hydrolyser l'ARN. L'ADN ainsi obtenu est sous forme dénaturée. Pour le cisailler afin d'obtenir des brins de longueur convenable pour les expériences de renaturation, nous avons essayé 3 techniques différentes :

a) cisaillement par sonication pendant un temps total de 4' sur position 5 (Branson Sonifier). (Essais avec 2 sondes différentes)
b) cisaillement au moyen d'un mixer Sorvall (Sorvall Inc.,USA) à 50 000 r.p.m. pendant 35' dans les mêmes conditions préconisées par Britten et al. (1974)
c) hydrolyse de l'ADN en présence de 0.3 N NaOH à 100^{o} pendant 20'.

Par sonication ou par mixer, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des fragments d'ADN plus petits que 10 S alors que par NaOH nous avons obtenu des fragments de 7.1 S, ce qui représente une longueur moyenne de 630 bases(Studier 1965). L'impossibilité de cisailler davantage par mixer ou sonication est probablement due à la configuration plus compacte que prend l'ADN lorsqu'il est dénaturé, par opposition à la structure plus linéaire (= rigide) lorsqu'il est àl'état natif. Nous avons donc opté pour un traitement à NaOH pour hydrolyser tous nos ADN.

1.3. Préparation des ADN

Nous avons conservé l'ADN à -20^{o} dans 10 mM PB-1 mM EDTA après congélation rapide dans CO_2/EtOH plutôt que de garder la solution à 4^{o} sur une goutte de chloroforme. Il se peut en effet que vu la concentration élevée d'ADN on ait, sous ces dernières conditions, renaturation des séquences répétitives ce qui peut conduire à la formation d'agrégats. Les échantillons prélevés de cette solution peuvent n'être plus représentatifs de l'ensemble. D'autre part, la présence, même en trace, d'activité DNAasique peut conduire à une hydrolyse partielle du matériel. Nous

avons rencontré quelques difficultés lors de la préparation de M-ADN. Les problèmes soulevés étant des questions de rendement, surtout lors des précipitations à l'EtOH (80 %, 0.2 M AcONa). En effet, lors de précipitations à EtOH, nous avons enregistré des pertes de 80 à 90 %, dues probablement à la concentration trop faible d'ADN présent lors de la précipitation (1-5 µg/ml d'ADN). La procédure que nous avons suivie (voir MEM) évite donc les précipitations à EtOH. De plus, nous avons réuni en une étape l'hydrolyse de l'ARN et le "cisaillement" de l'ADN par traitement des acides nucléiques dans 0.3 N NaOH à 100^{o} pendant 20'. Des essais sur de l'ARN purifié montrent que dans ces conditions 99 % de l'ARN devient soluble dans 5 % de TCA. L'hydrolysat est ensuite dialysé puis lyophilisé. Cependant, même après dialyse extensive, nous nous sommes rendu compte que le lyophilisat contenait encore beaucoup de matériel radioactif soluble dans le TCA ce qui signifie que les 2' et 3' ribonucléotides formés n'ont pu être dialysés ; ceci est probablement dû à un effet Donnan lors de la dialyse. Pour se débarrasser de ces ribonucléotides, une purification sur un gradient alcalin de saccharose est nécessaire, suivie d'une nouvelle dialyse et d'une lyophilisation. Le procédé est plus long (2 dialyses + 2 lyophilisations + 1 gradient) mais nous pensons qu'il nous évite ainsi d'importantes pertes.

1.4. Colonnes d'hydroxyapatite (HAP)

L'HAP est une préparation spéciale de phosphate de Ca^{++} utilisée initialement pour la séparation des protéines. Le mécanisme de la liaison de l'ADN n'est pas encore bien compris. Un des agents intervenant dans la liaison de l'ADN bicaténaire pourrait être l'interraction de charges entre groupes phosphate. Sous certaines conditions, la liaison de l'ADN mono et bicaténaire à HAP est fonction de la concentration de phosphate dans le tampon d'élution. A des concentrations de phosphate faibles (0.01-0.03 M), l'ADN mono ou bicaténaire est adsorbé, alors qu'à des concentrations de phosphate intermédiaires (0.12-0.14 M) l'ADN monocaténaire est élué. Il faut une concentration de 0.4-0.5 M de PB pour

éluer l'ADN bicaténaire.

Afin d'éviter des liaisons non spécifiques (ADN monocaténaire non éluable dans 0.12 M à 60°) ou la formation de liaisons irréversibles (ADN non éluable dans 0.4 M à 60°) l'HAP est bouillie dans du tampon intermédiaire pendant 20' (Britten et al. 1974). Concernant l'utilisation ou non de SDS comme agent prévenant les liaisons non spécifiques lors de la séparation sur HAP (Britten et al. 1974), l'expérience suivante a été réalisée : 2 groupes de 2 échantillons chacun d'ADN natif purifié (E_{260}/E_{280} = 1.77 ; E_{260}/E_{230} = 2.33) de 40 µg et de 80 µg dans 0.12 M PB ont été passés sur 4 colonnes d'HAP et élués aux conditions standards (0.12 M-0.4 M PB, 60°). Le passage du premier groupe se faisant sans SDS tandis que le passage du second se faisant après un lavage de la colonne avec 0.4 % SDS dans 0. 12 M PB.Les fractions ont été récoltées puis précipitées avec 5 % TCA en présence d'ADN de thymus de veau comme " carrier". Le précipité a été lavé sur un filtre et compté. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

Groupe	µg d'ADN natif 1)	prélavage 2)	$\frac{\text{cpm élués}}{\text{cpm totaux}}$ 3)
I	40	-	9.2
	80	-	12.0
II	40	+	1.8
	80	+	2.8

1) µg d'ADN déposé dans la colonne d'HAP

2) prélavage de la colonne avec 0.12 M PB + 0.4 % SDS

3) $\frac{\text{cpm élués dans 0.12 M PB}}{\text{cpm totaux élués dans 0.12 M et 0.4 M PB}}$

Dans les 2 cas, la présence de 0.4 % d'SDS augmente la rétention de l'ADN double chaîne dans 0.12 M PB. Il est donc indiqué pour le dessein

que nous poursuivons.

Il est connu que la capacité de l'HAP varie de lot en lot. Nous avons donc mesuré celle du nôtre. Il apparaît que notre HAP peut contenir au moins 400 µg d'ADN/ml d'HAP ce qui est au-delà de nos exigences.

Le rendement (cpm totaux récupérés après précipitation au TCA 10 % rapportés aux cpm introduits au début de l'expérience) lors d'une expérience de renaturation peut varier de 45 à 90 %. Afin de connaître l'origine de ces pertes, nous avons mesuré les taux de perte d'ADN dans les diverses étapes de l'expérimentation.

a) adsorption de l'ADN aux parois de verre des récipients lors de la renaturation : la quantité d'ADN marqué au ^{32}P restant adsorbé aux parois des récipients en verre après incubation représente le 6 % environ de la quantité d'ADN introduite. La radioactivité a été mesurée par effet Cerenkov.

b) liaisons irréversibles de l'ADN à l'HAP : 8 % de l'ADN total marqué au ^{32}P élué aux conditions standards (0.12 M PB-0.4 M PB, 60^{o}) restent liés irréversiblement à l'HAP. La radioactivité a été mesurée par effet Cerenkov après dissolution de l'HAP de la colonne dans HCl 6 N.

c) précipitation de l'ADN dans du TCA après fractionnement par HAP : 20 à 30 % d'ADN sont perdus lors de la précipitation de l'ADN dans 10 % TCA en présence de 10 µg/ml de CT-ADN comme "carrier". Les mesures ont été faites par rapport à de l'ADN déposé sur des filtres GF/B et lavé au TCA 10 %.

1.5 Stabilité physico-chimique de l'ADN

Une autre cause à l'origine des pertes pourrait être due à l'échange du tritium entre les ^{3}H TMP incorporés dans l'ADN et H_2O lors d'incubations prolongées à des températures élevées (72^{o}). Dans le but de vérifier cette hypothèse, ^{3}H T-ADN a été renaturé à Cot 5874 (0.67 M PB, 72^{o}, 45 hrs) puis analysé sur gradient de saccharose alcalin ; en parallèle, nous avons centrifugé un contrôle représentant de l'ADN non traité(fig. a). Les profils représentent des cpm totaux (solubles

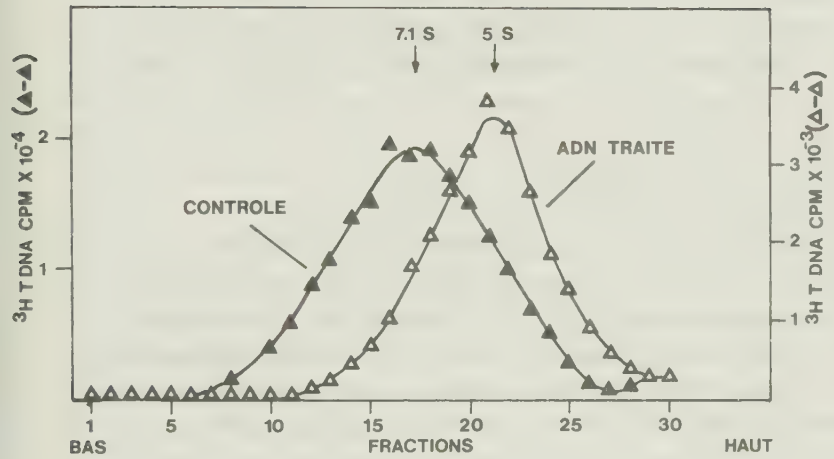


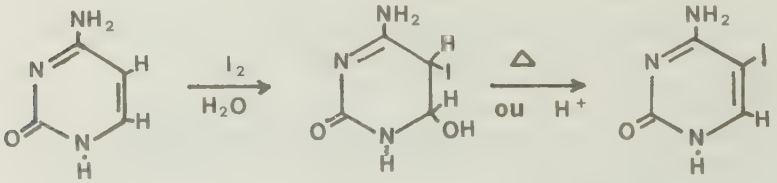
FIG. a Effet des conditions de renaturation sur la taille de l'ADN. Les échantillons traités (voir texte) ont été sédimentés dans des gradients de saccharose alcalin (5-20 % saccharose, 0.9 M NaCl, 0.1 N NaOH, 1 mM EDTA ; 45 Krpm/20°/SW 65/11h./nitrate de cellul.). 6 gouttes par fraction du gradient ont été collectées sur des papiers filtre. Les papiers ont été séchés et la radioactivité a été comptée en présence d'un mélange scintillant.

+ non solubles dans TCA). On récupère environ 90 % des cpm introduits dans le gradient. On voit que le pic de l'ADN traité s'est déplacé vers une valeur de 5 S (= 270 bases) alors que le pic de l'échantillon non traité se situe vers une valeur de 7.1 S. Les conditions utilisées ont donc pour effet de scinder l'ADN en fragments plus petits. Dans tous les cas, on n'observe pas de proportion inquiétante de ^{3}H non sédimentable (= non précipitable). Nous devons donc exclure ce phénomène d'échange de ^{3}H comme cause de perte.

1.6 Problèmes sur la iodination de l'ADN in vitro

1.6.1 Marquage de l'ADN à ^{125}I et purification de l'ADN iodiné

De l'ADN en solution aqueuse peut être iodiné in vitro par chauffage en présence d'iodure et de $TlCl_3$ à un pH de 5. L'iode est incorporé dans l'ADN par liaison covalente en position 5 de la cytosine donnant ainsi de la 5-iodocytosine. Il n'y a pas de réaction avec la thymidine ou l'adénine et très peu avec de la guanine. Suivant les conditions, plus de 95 % des cytosines de l'ADN monocaténaire peuvent être iodinées (Commerford 1971). Le mécanisme de l'iodination de la pyrimidine est probablement similaire à celui de la bromination de la pyrimidine proposé par Brammer (1963) et Yu et Zamecnik (1963).



cytosine

L'addition de IOH sur les positions 5,6 de la pyrimidine forme un intermédiaire peu stable : 5-iodo-6-hydroxyhydrocytosine. Ce composé a tendance à rétablir sa double liaison en 5-6 et à former la 5-iodocytosine par élimination d'H_2O. Cette réaction est favorisée par un pH

acide et par chauffage (voir tableau ci-dessus).
La technique est basée sur celle de Commerford (1971), modifiée par Holmes et Bonner (1974). La veille de la iodination, on prépare 300 ml de H_2O bidistillée, bouillie. Le jour de la iodination cette eau est déaérée et on l'utilisera pour la préparation de toutes les solutions. 5 µl d'une solution d'ADN dans 10 mM PB-1 mM EDTA (9.6 mg/ml) sont dilués dans 50 µl de H_2O. L'ADN est dénaturé par chauffage à 97° pendant 3' puis refroidi. On ajoute successivement 10 µl de 1.0 M AcONa-0.45 M AcOH, 25 µl de 10^{-4} M KI, environ 1 mCi de ^{125}I sous forme de NaI, sans carrier,dans 0.1 N NaOH (NEN) et enfin 10 µl de 6 mM $TlCl_3$ préparé dans les 30" avant utilisation. La solution est incubée pendant 20' à 60° puis refroidie dans de la glace. 10 µl de 0.1 M Na_2SO_3 et 20 µl de 1.0 M $AcONH_4$-0.5 M NH_4OH sont ajoutés. La solution est incubée à 40° pendant 30 . On ajoute ensuite 1 ml de 0.03 M PB. La mixture est chauffée à 97° pendant 5' et passée directement sur une colonne de 1 ml HAP prélavée avec 0.03 M PB à 60°. On élue avec 10 ml de 0.03 M PB pour enlever le ^{125}I libre puis avec 10 ml 0.12 M PB pour récupérer l'ADN iodiné. 21 % du ^{125}I total est élué avec 0.12 M PB. L'activité spécifique de l'ADN est de 5.1×10^6 cmp/µg d'ADN si l'on admet que la fraction éluée avec 0.12 M PB ne contient plus de ^{125}I libre. L'ADN iodiné est ensuite dialysé contre F, puis hydrolysé dans 0.3 N NaOH en chauffant à 97° pendant 20'. Il est ensuite purifié par sédimentation dans un gradient alcalin de saccharose (5-20 % saccharose 0.1 N NaOH, 0.9 M NaCl, 1 mM EDTA, 36 Kr.p.m./19h/20°/SW 40/nitrate de cel.). Les fractions contenant l'ADN sont poolées, neutralisées avec 2 volumes de 0.05 M tris pH 7.0 et 2 N HCl puis précipitées avec 2.5 volumes d'EtOH froid (éviter lyophilisation car risque de dissociation de ^{125}I et par suite, de contamination du lyophilisateur). Après centrifugation à 10 Kr.p.m./30'/4°/SW 27, le culot est repris dans 10 mM PB-1 mM EDTA pH 6.8, dialysé extensivement puis stocké à -20° après rapide congélation dans EtOH/CO_2. On récupère environ 10 % des cpm qu'on avait après passage sur colonne d'HAP. Nous avons de bonnes raisons de penser que ceci est dû principalement à l'étape de précipitation avec EtOH (voir annexe : prépara-

tion des ADN) et non à la présence d'^{125}I libre non élué avec 0.03 M PB ou créé lors de l'hydrolyse avec NaOH.

1.6.2. Cinétique de renaturation de ^{125}I T-ADN avec ^{3}H T-ADN en excès

L'idée à la base de cette expérience de renaturation était de marquer in vitro du M-ADN avec ^{125}I et de mesurer sa cinétique de renaturation en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN. Avant de nous engager dans le marquage et la renaturation de M-ADN nous avons réalisé l'expérience en partant de T-ADN froid.La fig. b révèle la cinétique de renaturation de ^{125}I T-ADN en présence d'un excès de 400 x de ^{3}H T-ADN. Alors que dans une renaturation de ^{3}H T-ADN avec lui-même on mesure 35 % de duplex formés à Cot 2, on n'en mesure plus que 15 % lors d'une renaturation ^{125}I T-ADN/^{3}H T-ADN. Il est clair que ^{125}I T-ADN se comporte différemment de ^{3}H T-ADN. Dans le but de vérifier si le processus de renaturation (empêchement stérique par exemple) est impliqué dans ces résultats, nous avons renaturé ^{125}I T-ADN en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN (24000 x) entre Cot 10 et 10^{3} ; nous avons comparé le % de duplex obtenu en soumettant l'échantillon soit à HAP (point de référence) soit à l'action de la nucléase S1.(La nucléase S1 hydrolyse dans nos conditions - tampon S1 + 0.011 M PB + 0.06 mM EDTA pH 4.6 - 90 % d'ADN dénaturé en 45' ; avec tampon S1 seulement elle hydrolyse 94 % du même ADN dans le même temps). Si c'est le mécanisme de la renaturation lui-même qui est en cause, on ne devrait observer pas ou peu de formation de duplex entre Cot 10 et 1000 en traitant avec S1. La fig. b montre le résultat de telles renaturations. On constate qu' après hydrolyse avec S1 il reste 10 % d'ADN sous forme de duplex entre Cot 10 et 300. Si le processus de renaturation était normal, on devrait observer environ 30 % de duplex (38 %-différence entre les résultats obtenus avec S1 et HAP). On fait la même observation à Cot 700 et 900 où l'on a avec S1 14 % et 17 % respectivement de duplex, pour 57 % (65-8) et 62 % (70-8) respectivement qu'on devrait obtenir. Notre conclusion par conséquent est que dans nos conditions ^{125}I T-ADN renature pas ou mal en présence de ^{3}H T-ADN probablement pour des raisons

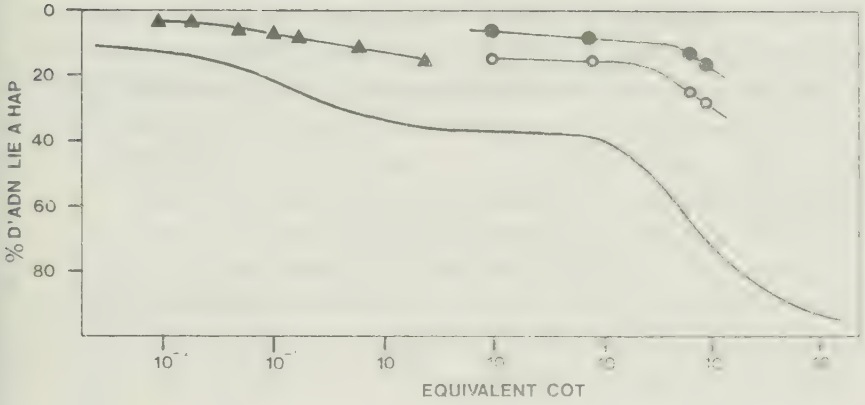


FIG. b Cinétique de renaturation de ^{125}I T-ADN en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN.
(▲) : ^{125}I T-ADN a été renaturé en présence de 400 x plus de ^{3}H T-ADN. Conditions de renaturation : 0.12 M PB, 60°. L'ADN a été fractionné sur HAP.
(○) : ^{125}I T-ADN a été renaturé en présence de 24 000 x plus de ^{3}H T-ADN. Conditions de renaturation : 0.20 M PB, 65°. Fractionnement sur HAP.
(●) : même préparation que précédemment mais dans ce cas le % de duplex a été mesuré par digestion avec l'enzyme S1.

stériques. Cette conclusion est supportée par Commerford (1971), qui mentionne que la iodination extensive d'ADN monocaténaire, jusqu'à 24 % des cytosines chez Cl. perfringens par exemple, altère le profil d'absorption aux UV, augmente sa densité et en particulier modifie son abilité à renaturer. Par contre, les propriétés physiques de l'ADN iodiné à l'état natif ne changent pas (profil de dénaturation thermique, abilité à renaturer, vitesse de sédimentation). L'iode occupe une position sur la cytosine équivalente à celle que prend le groupe méthyl sur la thymidine ou l'iode sur l'iodouracil ; par conséquent il ne devrait pas empêcher stériquement la formation de duplex. Pour l'instant la cause de cet empêchement n'est pas connue. Ce problème est d'autant plus vexant que d'autres(Holmes et Bonner 1974 ; Kraiselburd comm. pers.) ont utilisé avec succès cette technique. Malheureusement nous n'avons pas connaissance de l'étendue de la iodination des ADN utilisés par ces auteurs.

2 Problèmes relatifs à l'analyse de la teneur en bases de M-ADN

La technique qui a été utilisée (voir MEM et résultats)n'a pas donné entière satisfaction concernant la séparation de l'hydrolysat par électrophorèse. En effet, nous avons presque toujours eu des difficultés à délimiter les taches - observées aux UV - après la migration du matériel, ceci dû d'une part à la diffusion du matériel dans la cellulose et d'autre part aux traînées assez fréquentes reliant les taches. Il semble d'après nos expériences que l'interraction du phosphate inorganique sur la migration des nucléotides soit hors de cause. Nous avons en effet observé que lors d'une chromatographie avec du butanol saturé en H_2O, 3 % seulement des cpm déposés migraient. La présence des enzymes de digestion et des tampons dans la solution à séparer n'interfère pas non plus sur la migration. En effet, il n'y a pas de différence de migration ni de résolution entre une solution aqueuse contenant les 4 déoxynucléotides seulement et une solution contenent les mêmes marqueurs ainsi que tout l'appareil enzymatique et les tampons utilisés. Par contre, nous avons noté que le volume dépo-

sé jouait un rôle dans la résolution des taches : 60 µl à 70 µl étant une valeur limite supérieure. Il est possible enfin que l'efficacité de la digestion n'ait pas été optimale à cause de la présence de contaminants persistants dans le M-ADN. La technique de purification que nous avons suivie devrait pourtant fournir de l'ADN à un niveau élevé de pureté (voir MEM). Par conséquent, vu les incertitudes concernant l'expérimentation, nous estimons plus prudent de ne pas interpréter les résultats obtenus.

RESULTATS

1. Morphologie de la cellule P815

La fig. 1 montre l'aspect général au M.E. d'une cellule vue en coupe transversale. Selon nos mesures, le diamètre d'une cellule est d'environ 9 µm. On y distingue le noyau entouré des deux feuillets caractéristiques de la m.n.. A proximité immédiate du feuillet interne, et disposé en blocs le long de celui-ci, on remarque du matériel dense aux électrons: c'est de la chromatine condensée ou hétérochromatine. On peut voir aussi le nucléole qui est en relation avec la m.n..
La fig. 2 montre un agrandissement de la zone qui va être l'objet de notre étude. On y distingue des îlots d'hétérochromatine. Plusieurs pores nucléaires sont visibles.

2. Isolement et propriétés des noyaux

2.1 Isolement, rendement

Bon nombre de méthodes ont été publiées sur l'isolement et la purification des noyaux; la plupart impliquent l'utilisation de détergents tels que Triton X-100 (Hymer et Kuff 1964; Blobel et Potter 1966) NP40, DOC et Tween (Penman 1966). L'usage de détergents est cependant exclu si l'on veut étudier la m.n., car il a été montré (Barton et al. 1971; Aaronson et Blobel 1974; fig. 6 et 7) que dans le cas du Triton X-100 les noyaux peuvent perdre leur enveloppe tout en maintenant leur forme sphérique, ceci dans des solutions comparables aux nôtres.

Le tableau I résume les principales étapes que nous avons suivies pour la purification des noyaux à partir de cellules P815 et CHO.

Tableau 1

Etapes d'isolement et de purification des noyaux à partir de cellules P815 et CHO. Les détails expérimentaux sont décrits dans M & M.

1ère étape: choc hypotonique et homogénéisation dans un Dounce

	tampon hypotonique	jeu du Dounce inox
P815	TKM	15 µm
CHO	TM	20 µm*

*un jeu plus serré pourrait donner aussi de bons résultats (18-19 µm)

2ème étape: Purification (empruntée à Blobel et Potter 1966, avec modification)

	conc. de saccharose (M)	
	couche supérieure	coussin
P815	1.68	2.3 (ρ = 1.30 g/cm^3)
CHO	1.68	2.15 (ρ = 1.28 g/cm^3)*

*une concentration de saccharose comprise entre 2.3 M et 2.15 M n'a pas été essayée.

Sans détergent, dans le cas des P815 et des CHO, le rendement exprimé par $\frac{\text{nombre de noyaux purifiés}}{\text{nombre cellules}}$, mesuré par comptage direct au moyen d'un haemacytomètre, ou par $\frac{\text{radioactivité des noyaux}}{\text{radioactivité des cellules}}$ mesuré sur des cellules dont l'ADN avait été marqué, varie de 20 à 40%. Avec détergent, le rendement peut atteindre 80%.

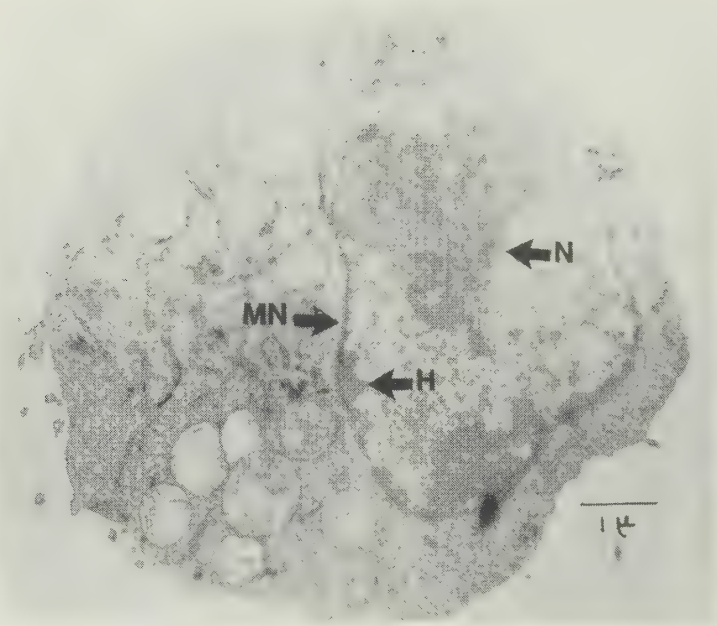


FIG. 1. Section d'une cellule P 815 vue au microscope électronique (voir MEM pour préparation). Les deux feuillets de la membrane nucléaire (MN) sont visibles. On note la présence de chromatine condensée (H) ; liée au feuillet, cette chromatine est disposée en blocs le long de la membrane nucléaire. La région nucléolaire (N) est aussi connectée à la membrane nucléaire.

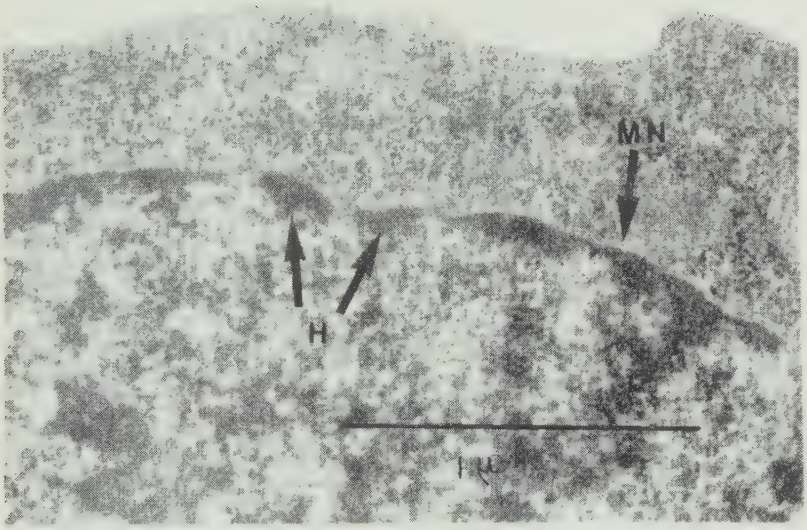


FIG. 2. Détail de la m.n. (MN) avec l'hétérochromatine associée (H). On distingue bien les îlots d'hétérochromatine disposés le long de la m.n..

2.2 Morphologie

La fig. 3 montre des noyaux de P815 purifiés sans détergent. On voit que les structures membranaires sont conservées et que l'intégrité du noyau est préservée. La fig. 4 montre un détail de la m.n. révélant les pores. A noter que la contamination cytoplasmique est très faible. La fig. 5 montre des noyaux de CHO. La morphologie générale est plus tourmentée. Ceci explique peut-être pourquoi la purification est plus laborieuse que celle des noyaux de P815, et aussi pourquoi le niveau de contamination, bien que faible, est plus élevé que chez les P815.

Les photos 6 à 9 montrent quelques noyaux de P815 traités au Triton X-100 lors d'expériences préliminaires. La grande majorité des noyaux apparaît comme dépourvue d'enveloppe nucléaire (fig. 6 et 7); le reste contient encore quelques lambeaux de m.n.. Le matériel granulaire présent à l'extérieur des noyaux et quelquefois entre la membrane et la masse nucléaire de noyaux partiellement dénudés (fig. 6 et 7) n'est pas de la contamination cytoplasmique (polyribosomes) mais provient du noyau lui-même et apparaît comme constitué de RNP et de DNP (voir plus loin). La fig. 7 nous permet donc de visualiser des sites d'attachement de la chromatine ou de RNP à la m.n.. Les fig. 8 et 9 présentent des évidences cytochimiques sur la nature chimique du matériel situé à l'extérieur des noyaux. L'ADN a été coloré spécifiquement selon la technique de Cogliati et Gautier (1973). Le halo contrasté visible autour des noyaux indique que ce matériel est constitué par de l'ADN. La présence (fig. 8) de zones claires dans ce halo peut indiquer la présence de RNP. L'usage de détergent pour la préparation des noyaux est donc tout à fait contre-indiqué pour le but que nous poursuivons.

2.3 Marquage de la membrane nucléaire

Plusieurs articles sur l'incorporation de la choline dans des phospholipides membranaires ont déjà été publiés (Plagemann 1968; Pasternak et Bergeron 1970; Bergeron et al. 1970; Sundler et Akesson 1975; Wojtczak et al. 1971; Tata et al. 1972). En particulier, l'article de Plagemann a montré que des cellules d'hépatome de rat utilisaient la

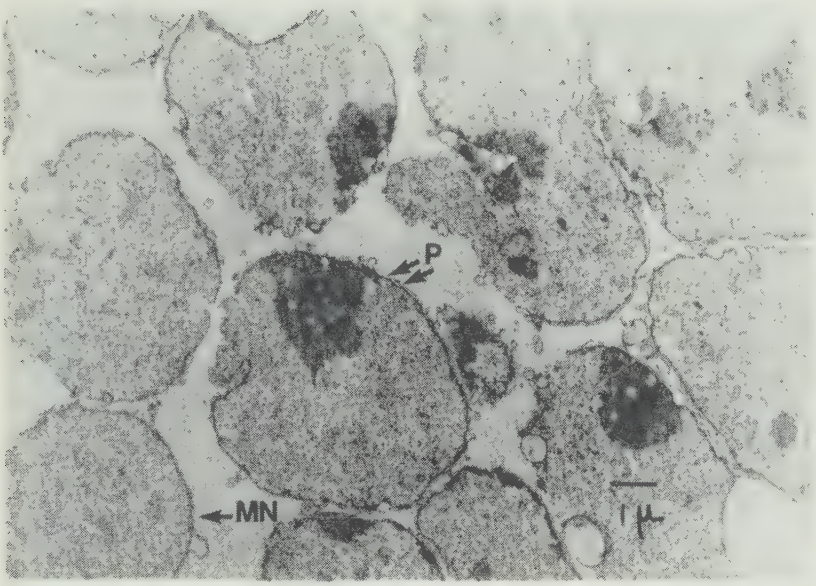


FIG. 3. Section de noyaux de cellules P 815 préparés sans détergent selon MEM. Les coupes ont été préparées selon MEM. On distingue les deux feuillets de la membrane nucléaire (MN), interrompus à certains endroits par les pores (P), la zone nucléolaire (N) toujours en relation avec la membrane nucléaire. Les vésicules (V) visibles sont certainement des lambeaux de m.n.. Nous n'avons jamais observé la présence de mitochondries dans nos préparations.

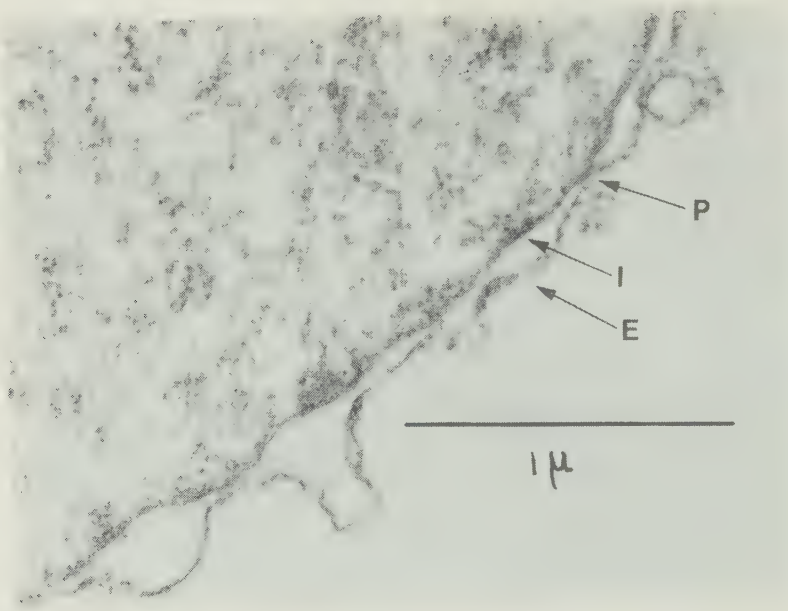


FIG. 4. Même préparation que fig. 3. Détail de la m.n.. Les deux feuillets internes et externes sont présents (I,E). On distingue un pore nucléaire (P). La présence de contamination cytoplasmique sur la membrane externe est négligeable.

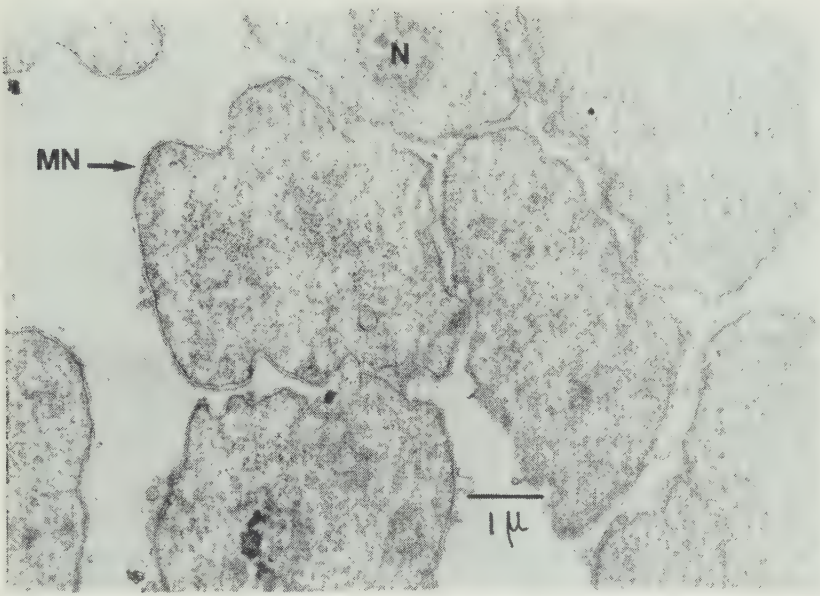


FIG. 5. Section de noyaux de CHO préparés selon MEM. On remarque la forme plus tourmentée. MN : membrane nucléaire, N : nucléole.

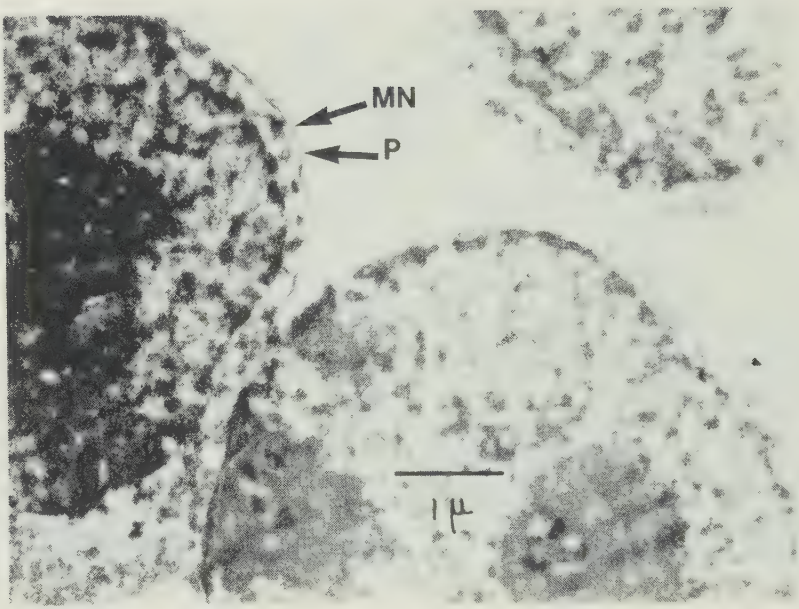


FIG. 6. Coupe de noyaux de cellules P 815. Les noyaux ont été soumis à l'action du Triton X-100 pendant l'isolement. A droite en bas, on distingue un noyau qui a presque complètement perdu son enveloppe nucléaire. A gauche un noyau possède encore partiellement son enveloppe (MN). Celle-ci est détachée du noyau laissant voir des interruptions dans sa structure qui sont certainement des pores (P). On peut voir aussi du matériel nucléaire attaché à la membrane nucléaire.

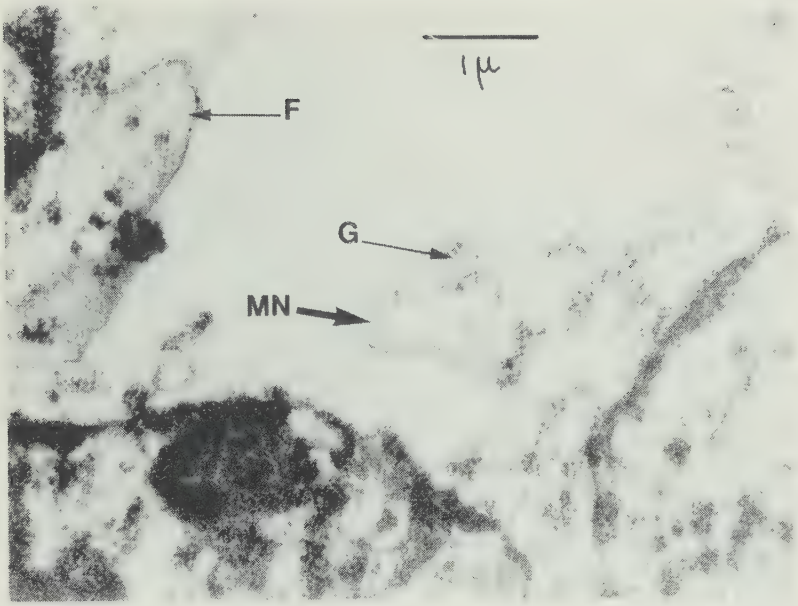


FIG. 7. Même matériel que fig. 6 mais vu avec un grossissement supérieur. On distingue des lambeaux de membrane nucléaire (MN) complètement détachés de la masse nucléaire. Des structures fibrillaires et globulaires sont liées à elle (F et G respectivement). La masse nucléaire apparaît comme dépourvue de structure membranaire.

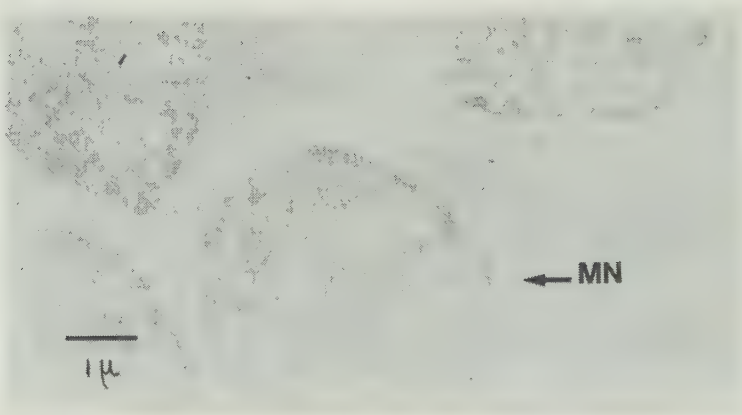


FIG. 8 Evidence cytochimique de la présence d'ADN à l'extérieur des noyaux de P 815 isolés en présence de Triton X-100. Les noyaux fixés avec glut/OsO_4 ont été décolorés avec H_2O_2, traités avec 5 N HCl, colorés avec de l'amine d'osmium (Coglíati et Gautier 1973). La coloration est spécifique pour l'ADN. La présence d'ADN autour du noyau est évidente. On distingue par endroits des fractions de m.n. grâce à la présence résiduelle d'OsO_4 dans la m.n. (MN).

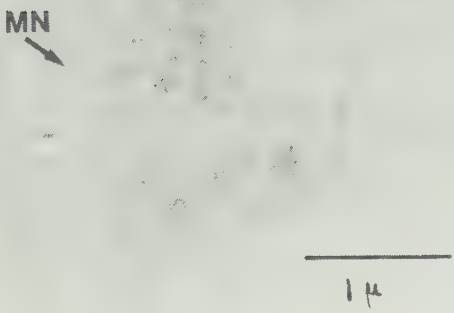


FIG. 9 Même préparation que sous fig. 8 mais à un grossissement supérieur. On distingue la m.n. (MN).

choline très rapidement; à l'intérieur de la cellule, la choline est métabolisée en phosphorylcholine. La phosphorylcholine est un précurseur dans la synthèse de la phosphatidylcholine par la voie Kennedy (Kennedy 1961). L'auteur montre en outre que 15% de la phosphatidylcholine synthétisée est associée au noyau, le reste étant incorporé dans les mitochondries et d'autres composants membranaires. Nos mesures d'incorporation avec de la choline radioactive nous indiquent qu'environ 20% de la choline totale incorporée se trouve dans le noyau, de qui confirme les résultats mentionnés plus haut. Cependant, nos analyses des constituants (lipides, ac. nucléiques, protéines) montrent qu'environ 6% de la radioactivité nucléaire, soit 1,2% du total cellulaire, se trouve dans les acides nucléiques. Hancock (comm. pers.) trouve dans le foie de rat 8.9% de la radioactivité totale incorporée due à la ^{3}H-choline dans l'ARN ainsi que 8.9% dans l'ADN. Cet état de fait peut jouer un rôle dans l'interprétation de certains résultats obtenus avec un marquage simultané de ^{3}H-TdR et ^{14}C-choline, notamment dans les expériences visant à étudier la liaison de l'ADN à la membrane nucléaire. Dans le cas du complexe ADN-m.n. isolé et marqué avec ces deux précurseurs radioactifs, ce phénomène conduit à une sous-estimation du rapport ^{3}H-ADN/^{14}C-m.n.. Le facteur de correction est égal à $\frac{^{14}C \text{ mesuré}}{^{14}C \text{ m.n.}}$. En admettant selon nos résultats que 6% des cpm dus à la ^{14}C-choline sont incorporés dans l'ADN, le facteur de correction sera de 100/100-6 = 1.06 environ.

3. Isolement de la membrane nucléaire

Dans notre cas, les techniques que nous utiliserons devront laisser dans la mesure du possible la membrane nucléaire et les éventuels sites d'attachement de l'ADN tels qu'ils sont in vivo. Deux techniques ont été utilisées dont les points communs sont:

1) action hypertonique sur les noyaux qui provoque leur éclatement, probablement dû à la dissociation de l'histone F1 qui, en se détachant de la chromatine, entraîne le dépaquetage de celle-ci;

2) cisaillement de la chromatine soit par mixage rotatif, soit par la DNAase 1.

La fig. 10 A et B montre les profils de radioactivité qu'on obtient lors de l'isolement de la m.n. soit par la méthode à la DNAase 1 (fig. 10A) soit par la méthode au Mg^{++} (fig. 10B). Le tableau II permet de comparer les deux techniques au point de vue de la distribution de la radioactivité dans les diverses fractions.

Tableau II

Distribution de la radioactivité des profils obtenus lors de l'isolement de la m.n. de P815 selon la technique à la DNAase 1, ou selon la technique au Mg^{++}. La m.n. provient de cellules qui ont été marquées pendant la croissance logarithmique avec ^{14}C-choline (0.015 µCi/ml) et ^{3}H-TdR (0.3 µCi/ml) durant 18 heures.

	^{3}H-TdR		^{14}C-choline	
	m.n.	culot	m.n.	culot
DNAase 1	1 %	2 %	80-90 %	4 %
Mg^{++}	3-5 %	6 %	62 %	10 %

Les résultats représentent le pourcentage de la radioactivité totale des noyaux retrouvée dans les fractions. Le culot est représenté dans les deux cas pour la plus grande partie par des nucléoles à en juger par la microscopie optique. Au M.E., les interfaces ("1.13-1.24" pour la méthode à la DNAase 1 et "1.16-1.22" pour la méthode au Mg^{++}) renferment des structures lamellaires avec des pores caractéristiques de la m.n.. Les fig. 11 à 13 permettent de visualiser directement la m.n. de CHO après isolement par la méthode à la DNAase 1. La fig. 11 montre une enveloppe nucléaire (= "ghost") vidée dans son contenu. Ces "ghosts" sont aussi détectables au microscope optique. On distingue bien la zone de rupture de la membrane, lors du gonflement du noyau; cette rupture est due à l'action du tampon hypertonique. La fig. 12 montre un lambeau de membrane nucléaire. On y distingue bien les pores.

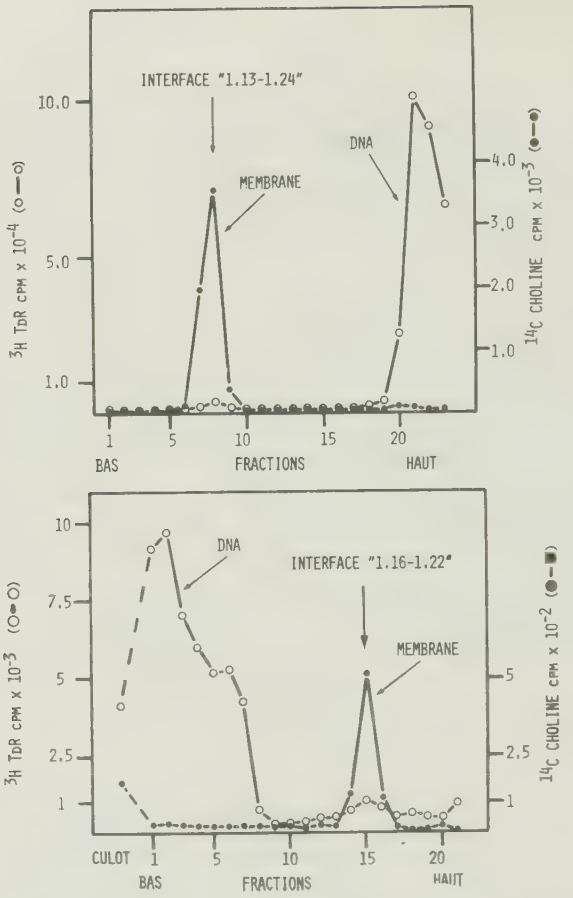


FIG. 10 A : Isolement de la m.n. de noyaux P 815 par la méthode à la DNAase 1. Des cellules ont été marquées à la ^{3}H TdR et à la ^{14}C choline. Après digestion des noyaux à la DNAase pendant 10', le lysat a été centrifugé dans un gradient de densité discontinu de TNaM-saccharose. La m.n. se trouve à l'interface des solutions de densité 1.13 g/cm^3 et 1.24 g/cm^3. La majeurepartie de l'ADN a été hydrolyséeen petits fragments qui n'ont pas sédimenté. B : Isolement de la m.n. de noyaux P 815 par la méthode au Mg^{++}. Les noyaux marqués à la ^{3}H TdR et à la ^{14}C choline, ont été repris dans TMEx et soumis à l'action d'un mixer rotatif. Le lysat a été centrifugé de bas en haut dans un gradient de densité discontinu de TMEx-saccharose. La m.n. est montée jusqu'à l'interface des solutions de densité 1.16 g/cm^3 et 1.22 g/cm^3. La majeurepartie de l'ADN est resté au fond du tube.

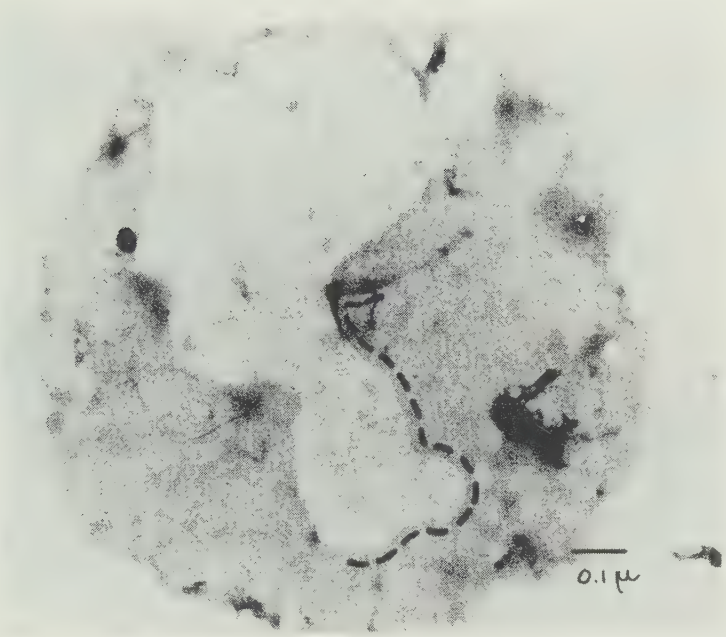


FIG. 11 Etalement sur H_2O de m.n. isolée à partir de noyau de CHO par la technique à la DNAäse 1. On distingue la zone de rupture de la m.n. (traitillé). Le noyau a été vidé de son contenu et paraît flétri.

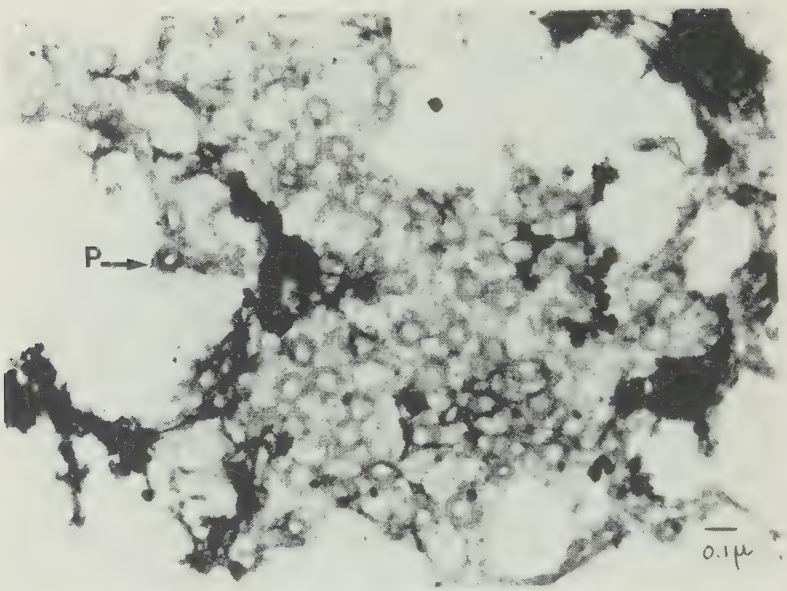


FIG. 12 Même préparation que fig. 11 mais vu à un grossissement plus fort. On distingue bien les pores nucléaires (P).

On trouve parfois des pores isolés comme le témoigne la fig. 13 ce qui suggère que la membrane nucléaire n'est pas requise pour le maintient de l'intégrité structurale de ceux-ci (Aaronson et Blobel 1974). La fig. 13 permet aussi de distinguer 4 granules faisant partie de l'anneau délimitant. Cette structure granulaire de l'anneau a été mise en évidence par Franke (1970) en particulier. Selon cet auteur, ces granules se retrouvent 8 fois autour du pore dans la plupart des systèmes étudiés.

4. Propriétés de la m.n.

4.1 Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide contenant du SDS

Les protéines de la m.n. et de la NM-chromatine ont été séparées par électrophorèse dans des gels de polyacrylamide contenant du SDS, puis colorées au bleu de Coomassie. Le profil d'absorption des protéines (λ = 570 nm) est représenté sur la fig. 14 A et B. On a arbitrairement divisé les protéines de la m.n. en 4 groupes. On voit que la m.n. possède proportionnellement plus de protéines de PM >40 Kd que la chromatine; le premier groupe comprend une protéine de PM >220 Kd qui d'après sa migration pourrait être de la myosine (voir discussion). Les protéines des groupes 2 et 3 ont un PM compris entre 50 et 100 Kd. Le groupe 4 comprend 2 protéines qui d'après leur migration pourraient être les histones F2a1 et F3. Leur présence dans le gel indique qu'elles sont fortement liées à la m.n. vu le traitement imposé lors de la préparation de la m.n. (voir légende de la fig. 15). Quantitativement elles se trouvent dans un rapport de 1 approximativement (il est difficile de connaître le rapport précis du fait de la présence de F2b très proche de F3). Au total, on inventorie au moins une cinquantaine de protéines dans l'échantillon membranaire. La fig. 15 est une photographie montrant l'aspect des gels. La NM-chromatin (A) isolée par la méthode à la DNAase 1 a été comparée à la chromatine isolée par détergent NP40 (B). Le contenu protéique des deux préparations apparaît comme semblable qualitativement. Quantitativement on note cependant quelques différences. C représente des marqueurs protéiques de PM

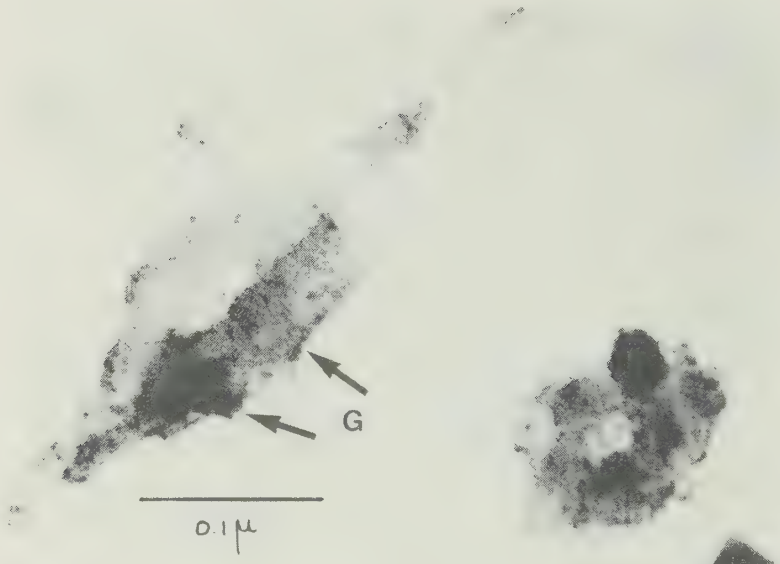


FIG. 13 Même préparation que fig. 11 : pores nucléaires isolés. On peut voir les granules annulaires (G).

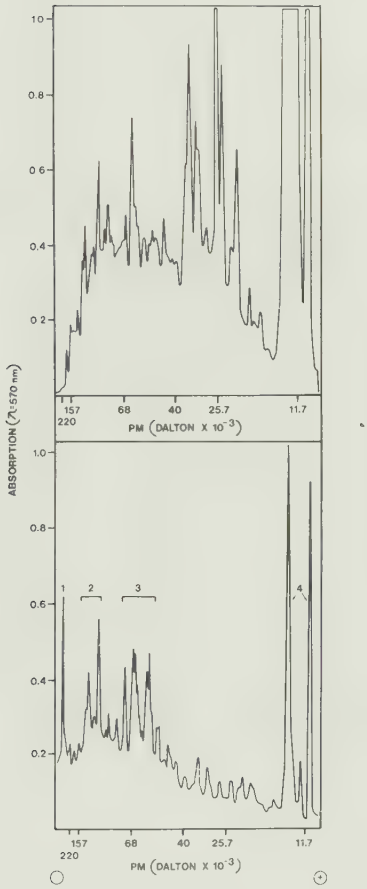


FIG. 14 Profils d'absorption (λ = 570 nm) des protéines de NM-chromatine (A) et de m.n. (B) d'après les gels de la fig. 15. En abscisse on a indiqué les PM de marqueurs.

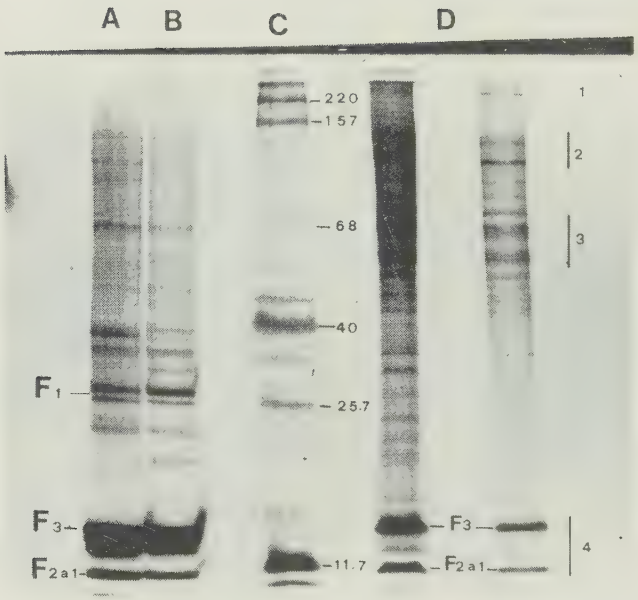


FIG. 15 Photo des gels de polyacrylamide contenant du SDS après séparation des protéines par électrophorèse. A : NM-chromatine ; B : chromatine isolée avec NP 40 ; C : marqueurs ; D : m.n..La m.n. de noyaux P 815 a été isolée par la méthode à la DNAase 1. Les protéines du surnageant obtenu comme dans la fig. 10 A ont été analysées par électrophorèse (=NM-chromatine). L' ADN restant attaché à la m.n. a été hydrolysé une seconde fois à la DNAase pendant 40' à 37°. La m.n. a ensuite été purifiée sur gradient de saccharose-TNaM, reprise dans 1.5 M NaCl puis sédimentée au travers d'un coussin de saccharose contenant 1.5 M NaCl puis analysée sur gel. Les PM des marqueurs sont indiqués en milliers de daltons.

connus. D représente deux gels provenant de m.n. isolée par la méthode à la DNAase I.

4.2 Densité de flottaison de la membrane nucléaire

Nous nous posons la question de savoir quelle est la densité de la m.n.. La m.n. de P815, isolée par les deux techniques, a été centrifugée à l'équilibre dans des gradients linéaires de saccharose contenant soit TMEx soit TNaM (fig. 16 et 17). On voit que dans les deux cas la m.n. a une densité de 1.18 g/cm^3. Cependant cette densité peut varier de 1.18 g/cm^3 à 1.28 g/cm^3 selon les conditions ioniques présentes dans le gradient de saccharose.

L'expérience suivante a été faite: des noyaux marqués (m.n. et ADN) ont été lysés avec de la DNAase dans TNaMEx. La m.n. a été isolée après sédimentation à l'équilibre dans un gradient de TNaM. Une partie a été dialysée contre TKM et l'autre contre TNaM. Chaque partie a été centrifugée à l'équilibre dans un gradient de saccharose contenant le tampon correspondant. Les profils montrent que dans le gradient de TKM la m.n. a une densité de 1.28 g/cm^3 environ; la plus grande partie de l'ADN a sédimenté avec elle. Dans le gradient TNaM la m.n. a une densité de 1.18 g/cm^3 et la majeure partie de l'ADN se trouve au sommet du gradient. Le tableau III récapitule les densités obtenues dans différents gradients de densité.

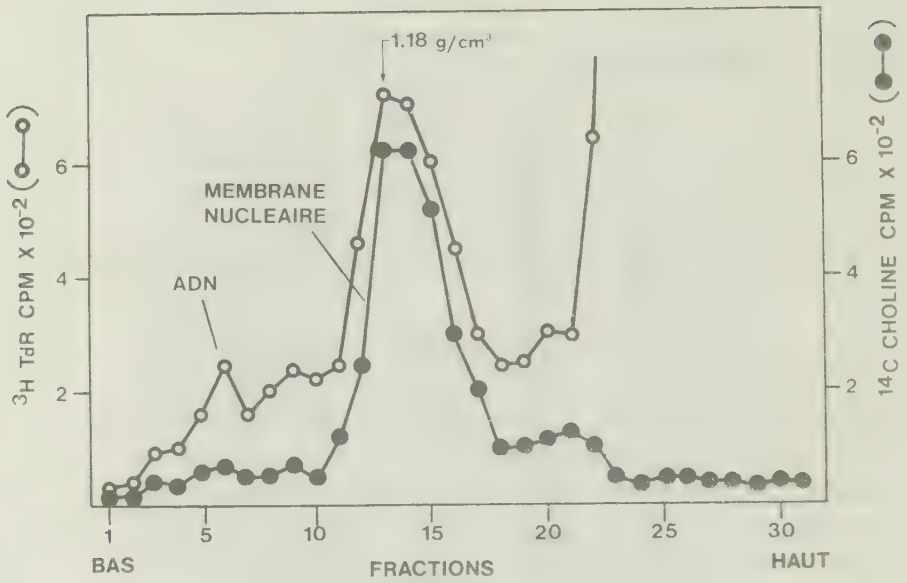


FIG. 16 Sédimentation à l'équilibre de la m.n. de P 815. La m.n. a été isolée par la méthode à la DNAase I puis sédimentée à l'équilibre dans un gradient de saccharose-TNaM.

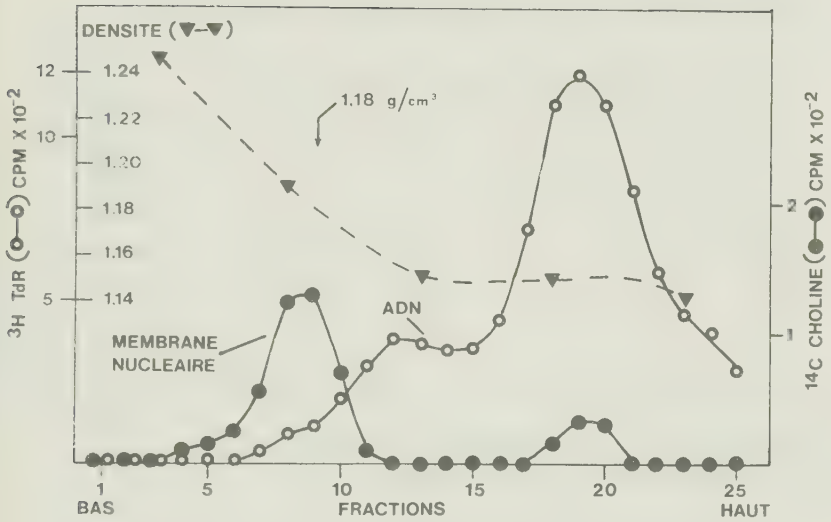


FIG. 17 Sédimentation à l'équilibre de la m.n. de P 815. La m.n. a été isolée par la méthode au Mg^{++} puis sédimentée à l'équilibre dans un gradient de saccharose-TMEx.

Tableau III

Variation de la densité de la m.n. de P815 isolée par différentes méthodes, en fonction des conditions ioniques présentes dans le gradient de saccharose.

Conditions ioniques dans le gradient de densité	°C	pH	(g/cm^3)	Mode de prép.
1. 0.07 M KCl, 10 mM Phosphate	4°C	7.4	1.20	1)
2. 1.5 M NaCl, 10 mM Tris	4°C	7.4	1.18	2)
3. CsCl-10 mM Tris	20°C	7.4	1.18	3)
4. TNaM	4°C	7.4	1.18	4)
5. TMEx	4°C	7.4	1.18	3)
6. TKM	4°C	7.4	1.26-1.28	4)

1) sonication; 2) homogénéisateur + sonication;
3) technique au Mg^{++}; 4) technique à la DNAase I.

En plus des densités, les fig. 16 et 17 montrent que dans les deux gradients une partie de l'ADN isolé précédemment avec la m.n., s'est détaché de celle-ci et reste après centrifugation au haut du tube. Dans les deux cas, 90 à 95% de l'ADN mis sur le gradient n'a pas sédimenté avec la m.n.. Ce détachement n'est pas dû à la destabilisation de la liaison ADN-m.n. par la force ionique présente dans les gradients mais plutôt à la destabilisation de la m.n. elle-même (voir discussion).

5. Détachement de l'ADN isolé avec la m.n.

5.1 DNAase I

Après un premier isolement par la méthode à la DNAase I, la m.n. de P815 a été traitée une seconde fois à l'enzyme dans le but de voir si l'ADN restant est toujours accessible et, dans l'affirmative dans quelle mesure, ou s'il est pris dans la masse membranaire et ainsi protégé d'un traitement enzymatique (dans ce cas-là, on l'appellera ADN cryptique). La fig. 18 montre qu'après 3 h. d'une deuxième

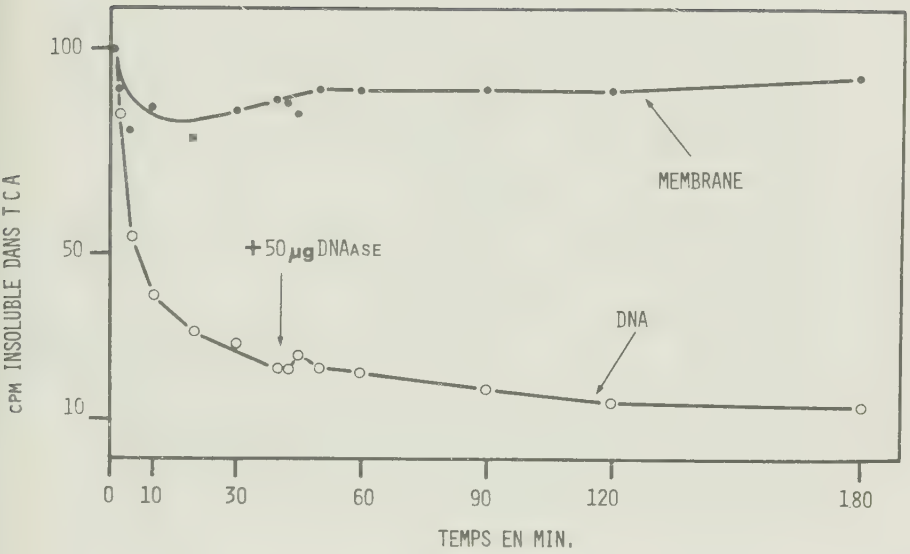


FIG. 18 Cinétique de digestion de l'ADN du complexe ADN-m.n. par la DNAase 1. La m.n. de P 815 a été isolée par la méthode à la DNAase. Elle a été ensuite incubée à 37° en présence de DNAase (30 µ g/ml, TNaMEx). Des aliquotes ont été prélevées aux temps indiqués et précipitées dans du TCA 5 %.

digestion il reste encore 14% d'ADN toujours précipitable au TCA. La fig. 19 répond à la question de savoir si ces 14% sont toujours liés à la membrane. Un échantillon digéré pendant 3 h. a été mis sur un gradient discontinu de saccharose-TNaM et centrifugé à l'équilibre. Il apparaît que la plus grande partie de la m.n. (^{14}C-choline; ρ = 1.18 g/cm^3) est libre d'ADN. Si nous estimons la limite de détection à 10 cpm par fraction, cela signifie qu'il y a $\leq$0.5% de l'ADN total dans le gradient qui se trouve encore attaché à la membrane. En d'autres termes, nous pouvons dire qu'il reste 1 x 10^{-2} x $\leq$ 0.5 x 10^{-2} $\leq$ 0.5 x 10^{-4} soit $\leq$ 0.005% d'ADN nucléaire toujours attaché à la membrane après un tel traitement. Une petite fraction de m.n. reste au haut du gradient avec l'ADN digéré. Cette fraction peut représenter des particules de membrane très petites, donc non sédimentables, liées ou non à l'ADN, ou de l'ADN lui-même (voir résultats sur marquage de la m.n. ainsi que la discussion sur la stabilité de la m.n.).
La conclusion pratique de cette expérience est que l'ADN lié à la membrane n'est pas cryptique. La fig. 20 montre une préparation de la m.n. ayant suivi un traitement extensif à la DNAase I puis été lavée par centrifugation. On peut noter les structures lamellaires, caractéristiques des membranes. Les formes vésiculaires sont des artéfacts de préparation. La fig. 21 est un fort grossissement de cette même préparation montrant des pores avec un granule central. Ceci nous confirme que nous sommes bien en présence de m.n. d'une part, et que, vu la présence de granule central dans les pores, le traitement imposé à la m.n. est doux.

5.2 Traitement de la m.n. dans des solutions de NaCl

L'effet de la force ionique sur le complexe a été étudié dans le but de voir si l'attachement de l'ADN à la membrane nucléaire est de nature ionique. Le principe de l'expérience est le suivant: les noyaux, dont l'ADN est marqué à la ^{3}H-TdR et la membrane à la ^{14}C-choline, donc de rapport ^{3}H/^{14}C déterminé, sont lysés et cisaillés par la technique au Mg^{++}. Le lysat est centrifugé dans diverses solutions de concentrations connues de NaCl. Le rapport ^{3}H/^{14}C du matériel dans le culot est

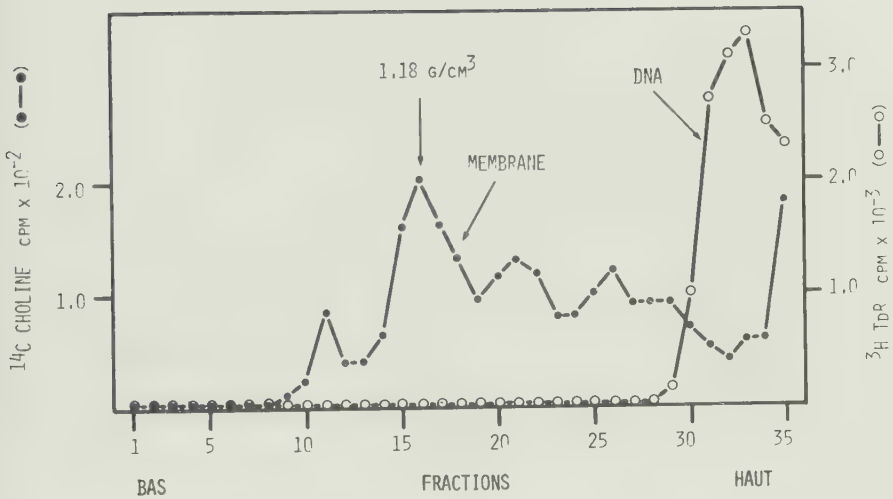


FIG. 19 Sédimentation à l'équilibre de la m.n. de P 815.La m.n. a été isolée par la méthode à la DNAase, traitée une nouvelle fois à la DNAase pendant 3 heures à 37° puis centrifugée à l'équilibre dans un gradient de TNaM-saccharose.

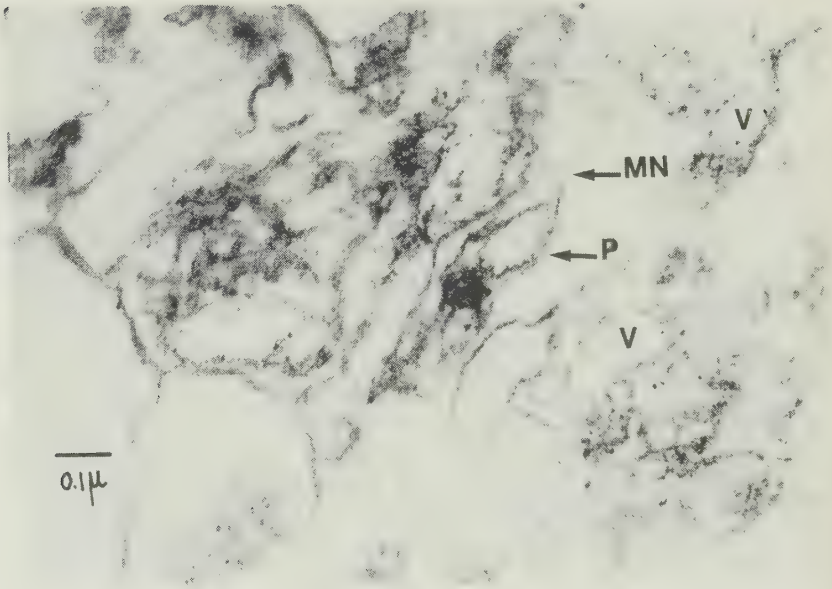


FIG. 20 Section de m.n. de P 815. La m.n. a été isolée par la méthode à la DNAase 1 et soumise à un nouveau traitement extensif à la DNAase, puis sédimentée . Le culot a été préparé pour la microscopie électronique selon MEM. On distingue les structures lamellaires (MN). Certaines jonctions des deux membranes pourraient représenter des pores (P). La présence de vésicules (V) est un phénomène commun observable dans les membranes isolées.

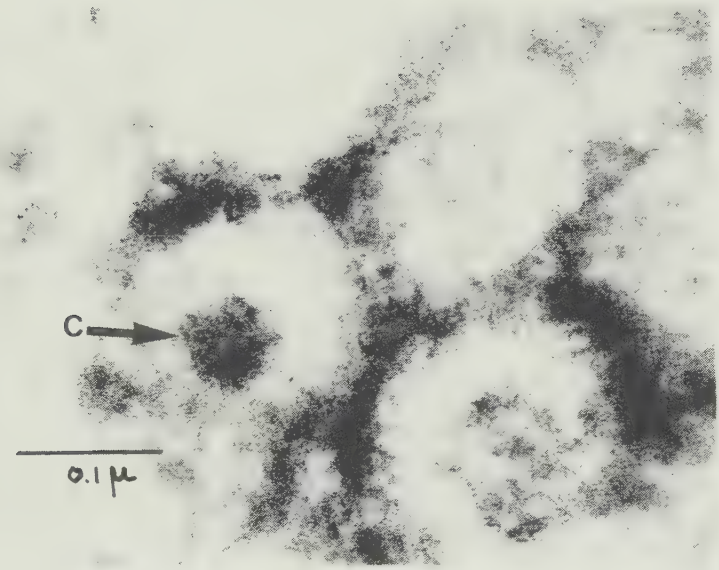


FIG. 21 Section de pores nucléaires. Même préparation que fig.22. Les trois structures présentent un granule central plus ou moins visible (C).

mesuré; la comparaison des deux rapports $^{3}H/^{14}C$ doit nous donner une indication sur le détachement de l'ADN par unité de membrane pendant la centrifugation. Un détachement doit se manifester par une diminution du rapport $\frac{^{3}H/^{14}C \text{ culot}}{^{3}H/^{14}C \text{ total}}$ alors qu'un rapport constant ne traduira aucun détachement. Cette technique est compliquée, à certaines concentrations de NaCl, par la précipitation indésirable de chromatine n'ayant aucun rapport avec la membrane. Pour étudier spécifiquement la labilité de la liaison ADN-membrane, en particulier dans les régions de force ionique ≤ 0.3 NaCl, nous avons déposé la solution à analyser sur la solution de lavage ayant une densité supérieure et, pour éviter toute interaction à l'interface, nous avons introduit une couche de densité intermédiaire d'environnement ionique identique à celui de la solution à analyser. Ainsi le problème de précipitation non spécifique est résolu. Cependant, dans ces conditions, le complexe n'est plus soumis à l'action de la force ionique que pendant le temps qu'il mettra à sédimenter; en assumant que l'action de la force ionique est instantanée, le temps de lavage sera toujours suffisant. Les expériences ont été réalisées à des températures de 4°C, 20°C et 34°C dans le but de voir si dans des conditions thermiques se rapprochant de celles in vivo on observait toujours la même stabilité. Le tableau IV résume les résultats obtenus aux trois températures expérimentales.

Tableau IV

Etude de la stabilité du complexe ADN-m.n. marqué à la ^{3}H-TdR et à la ^{14}C-choline en fonction de la force ionique. Les détails expérimentaux sont décrits dans le texte. Les chiffres figurant dans le tableau expriment le rapport $\frac{^{3}H/^{14}C \text{ culot}}{^{3}H/^{14}C \text{ total}} \times 10^{2}$

		NaCl (M)									
°C	Exp.	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	2.0
4°	3	15			13	11	13	16	14		
	4	8.1			7.4				7.9		
	5	7.4			7.2				7.3	9.7	9.4
	6	5.3	4.6	5.7							
20°	5	6.6			6.5				6.6	4.5	5.7
34°	6	10.8	7.5		7.7				9.0		

Par ces résultats, on conclut que la liaison de l'ADN à la membrane nucléaire est stable vis-à-vis de l'environnement ionique, ceci entre 4°C et 34°C.

5.3 Traitement de la membrane nucléaire dans l'urée ou la formamide (FA)

Ayant exclu la possibilité d'une interaction ionique entre l'ADN et la membrane nucléaire, nous nous posons maintenant la question de savoir si l'ADN est maintenu à la m.n. par des liaisons de type hydrogène. Nous avons donc soumis le complexe à l'action d'agents dénaturants tels que l'urée ou la formamide, à des concentrations variables, en suivant la même technique décrite précédemment et avec 0.5 M NaCl dans le milieu de lavage de façon à éviter une précipitation de chromatine. Toutes les expériences ont été faites à température ambiante. Les rapports $^{3}H/^{14}C$ avant et après traitement ont été comparés. La fig. 22A révèle le comportement du complexe en présence de FA; jusqu'à 5%, la liaison est stable; entre 5 et 10% elle se déstabilise brusquement:

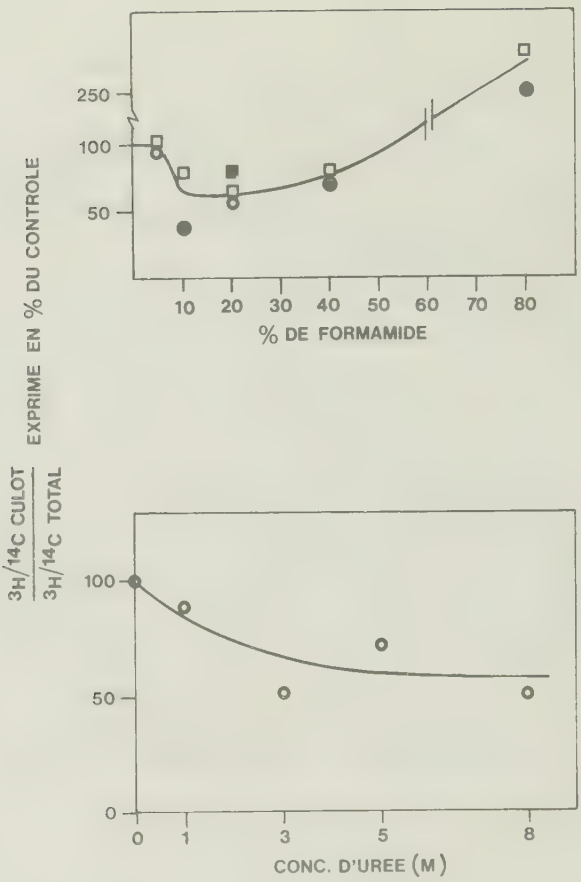


FIG. 22 Effet de la formamide (A) ou de l'urée (B) sur le détachement de l'ADN lié à la m.n.. Des noyaux de P 815 marqués à la ^{14}C choline et à la ^3H TdR ont été traités par la méthode au Mg^{++}. Des aliquotes du lysat ont été centrifugées dans des solutions de concentrations variables d'urée ou de formamide selon la technique décrite dans le texte. Le rapport $\frac{^3H/^{14}C \text{ culot}}{^3H/^{14}C \text{ total}}$ a été calculé dans chaque cas et exprimé en % du contrôle.

30 à 40% de l'ADN attaché est libéré. Par contre, à 80% de FA, on a 2.7 fois plus d'ADN dans le culot que le contrôle. Ceci est probablement dû au fait que l'ADN dans ces conditions est dénaturé et s'attache d'une manière non spécifique à la membrane (voir discussion). La fig. 22B indique aussi une destabilisation de la liaison en présence d'urée. Là encore on observe qu'à partir d'une concentration de 3M d'urée, 40% d'ADN s'est détaché par rapport au contrôle.

5.4 Traitement de la m.n. par du détergent ou de la pronase

Nous avons observé l'action sur le complexe isolé par la méthode au Mg^{++} d'un détergent non ionique (NP40) ou d'une protéase. Après traitement, le complexe a été centrifugé à l'équilibre en présence de CsCl (fig. 23). Bien que certains points soient encore ambigus(voir plus bas), les profils indiquent que 1) la pronase dissocie en partie la membrane en sous-unités de densité plus faible ($\rho < 1.18$ g/cm^3) contenant des lipides (^{14}C-choline) et de l'ADN (^{3}H-TdR), 2) NP40 a la même action, mais que la dissociation de la membrane est plus importante. Dans le cas de l'échantillon traité à NP40, la quantité d'ADN par sous-unités de lipide (^{3}H/^{14}C) est 3 fois moins importante que le contrôle. Dans le cas de l'échantillon traité à la pronase, le rapport est 2.2 fois moins que le contrôle (Tableau V).

Tableau V

Quantification des résultats obtenus dans la fig. 23.g: gradient; c: culot; ρ <1.18 représente les 3 dernières fractions collectées dans les 3 gradients. Dans ces conditions, l'ADN se trouve au fond du tube (= début du gradient).

	^{3}H/^{14}C		b/a	Facteur de détachement b/a'(contrôle)/b/a (échant.)
	g + c (a)	ρ <1.18 (b)		
Contrôle	5.0	2.9	0.58	1
Pronase	6.9	1.8	0.26	2.2
NP40	4.1	0.18	0.19	3

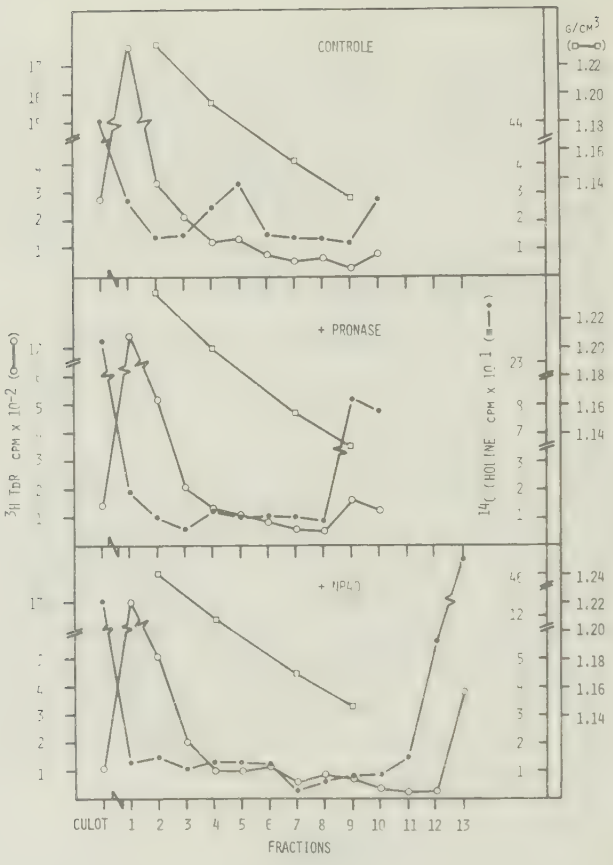


FIG. 23 Effet de la pronase et du NP 40 sur le complexe ADN-m.n. de P 815. Le complexe marqué à la ^{14}C choline et à la ^{3}H TdR a été isolé par la méthode au Mg^{++}, puis lavé par sédimentation dans le même tampon. Le culot a été repris dans 10 mM tris, pH 7.4 par brève sonication (2 fois 1 sec., position 4 du Branson Sonifier). Une partie a été traitée dans 0.2 % de NP 40 pendant 1 heure à 20°. Une autre dans 100 µ g/ml de pronase même conditions, une troisième servant de contrôle. Chaque partie a été centrifugée à l'équilibre en présence de CsCl (ρ initial : 1.2 g/cm^3 ; 33Krpm/20°/64h./SW 65/ polyallomer). Les fractions collectées ont été précipitées au TCA 5 %.

Il apparaît donc que pour une partie de la membrane au moins, la nature du terrain où l'ADN se lie à la membrane est lipoprotéique. Dans les 3 cas, nous notons aussi la présence d'un important culot contenant du tritium et du carbone 14. Par centrifugation à l'équilibre du complexe dans des gradients de CsCl, nous avons constaté que sa densité était plus élevée que 1.50 g/cm^3. Il est difficile pour l'instant de tirer une conclusion sur sa composition biochimique (voir discussion).

6. Propriétés de M-ADN

6.1 Propriétés physico-chimiques

Le but des expériences qui vont suivre est de voir si M-ADN isolé à partir de membranes nucléaires purifiées par la méthode au Mg^{++} se différencie de NM-ADN (≅ T-ADN). Pour cela, nous avons mesuré quatre paramètres: 1) profil sur gradients de CsCl 2) teneur en bases 3) sensibilité à la nucléase S1 4) cinétique de renaturation.

6.1.1 Gradient de CsCl

On voit (fig. 24) que M-ADN présente qualitativement le même profil que NM-ADN; quantitativement cependant, dans la zone du gradient correspondant à une densité de 1.690 g/cm^3, M-ADN contient relativement 2.4 fois plus d'ADN que NM-ADN. De par sa densité, on conclut que M-ADN est riche en séquences AT (Marmur 1962).

6.1.2 Détection d'ADN monocaténaire

Dans le but de détecter des brins d'ADN monocaténaires qui pourraient servir de point d'ancrage du M-ADN dans la membrane, le complexe membrane-ADN a été isolé par la méthode au Mg^{++} et directement soumis à la nucléase S1 en présence de détergents (SDS et Triton X-100). L'usage de détergents a pour but de dissocier la membrane et de libérer de l'ADN éventuellement pris dedans. La fig. 25 montre qu'après plus de 2 heures de traitement à l'enzyme S1 on n'observe aucune hydrolyse de l'échantillon en présence des 2 détergents. On note même une augmentation de la quantité de matériel radioactif précipitable (voir

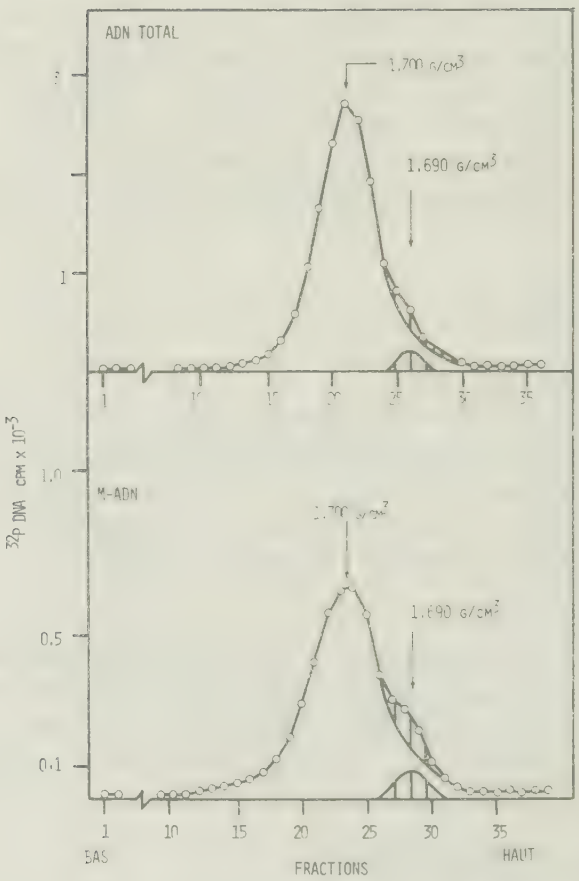


FIG. 24 Etude comparative du profil de M-ADN et de T-ADN de cellules P 815 dans des gradients de CsCl. M-ADN et T-ADN marqués in vivo au ^{32}P ont été purifiés selon la méthode décrite dans MEM. Un échantillon de chaque a été centrifugé à l'équilibre en parallèle dans une solution tamponnée de CsCl (ρ initial = 1.700 g/cm^3, 33 Krpm/20°/ 64h./SW 65/polyallomer).

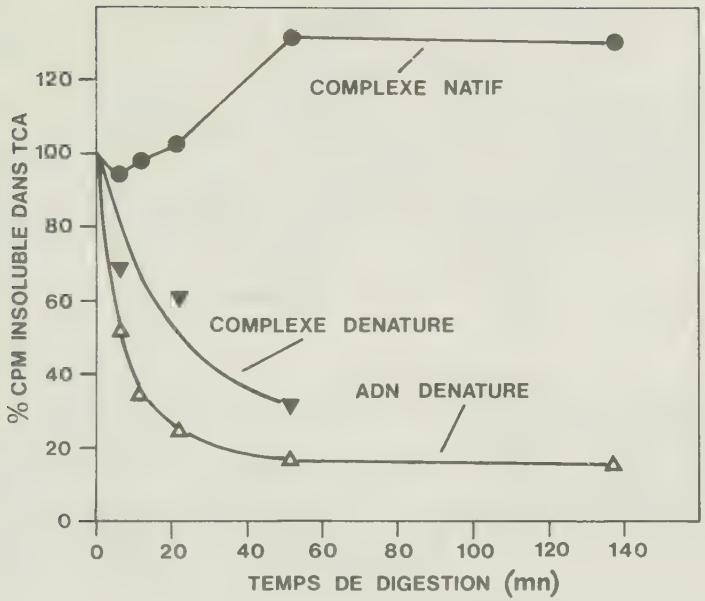


FIG. 25 Digestion de l'ADN du complexe par la nucléase S1. Le complexe marqué à la ^{3}H TdR a été isolé par la méthode au Mg^{++} puis lavé par centrifugation. Le culot a été repris dans le tampon de S1. Une partie a été dénaturée par chauffage à 100° pendant 10' puis hydrolysée avec S1 (▼). Une autre partie native a été soumise à S1 en présence de 0.08 % de SDS, 0.16 % de Triton X-100 (●). Dans les 2 cas l'hydrolyse s'est faite en présence de 10 µg d'ADN de thymus de veau dénaturé (Vogt 1972). Afin de vérifier l'activité de l'enzyme, une 3ème hydrolyse a été réalisée avec de l'ADN purifié et dénaturé en présence de 0.05 % de SDS et 0.27 % de Triton X-100 (△). 0.1 ml ont été prélevé aux temps indiqués et la réaction a été arrêtée par précipitation dans du TCA 5%.

discussion). Le complexe dont l'ADN a été dénaturé par chauffage et hydrolysé par S1 indique 70% de digestion. La fig. 25 montre encore qu'en présence de ces deux détergents, l'enzyme S1 est toujours active. Notre conclusion est par conséquent qu'il n'existe pas d'ADN monocaténaire en contact avec la membrane nucléaire.

6.1.3 Analyse de la teneur en bases de l'ADN par électrophorèse sur couche mince

Le tableau VI ci-dessous résume les résultats de deux expériences.

Tableau VI

Analyse comparée de la teneur en bases de M-ADN et NM-ADN ainsi que de l'ADN provenant de foie de souris.
M-ADN et NM-ADN marqués in vivo au ^{32}P ont été purifiés selon MEM. Après hydrolyse des ADN par la DNAase I et la phosphodiestérase, les 5'déoxynucléotides ont été séparés par électrophorèse sur des plaques de cellulose. Les taches ont été repérées au U.V. puis grattées et comptées en présence de toluène/PPO/POPOP et de Cab-O-Sil comme mélange thixotropique.

	A	G	Cyt	Thy	A/T	G/C	$\frac{A+T}{G+C}$
NM-ADN	29.8	21.1	22.5	26.3	1.13	0.93	1.28
M-ADN	20.1	26.5	22.1	31.2	0.64	1.20	1.05
Foie de souris (Kirby 1959)	29.2	21.7	19.7	29.4	0.99	1.10	1.41

Dans le cas de NM-ADN, les résultats sont en gros conformes à ceux que l'on attend pour la souris (Kirby 1959). Dans le cas de M-ADN cependant, les résultats sont inattendus. Deux points sont à relever: 1) le rapport des bases complémentaires s'écarte sensiblement de l'unité. L'écart est particulièrement frappant avec A/T où l'on note 1.56 fois plus de T que de A. 2) le rapport $\frac{A+T}{G+C}$ est de 1.05 ce qui signifie un enrichissement des séquences G+C dans M-ADN (50% de A+T et 50% de

G+C dans M-ADM par comparaison aux 57% de A+T et 43% de G+C dans NM-ADN).

Nous estimons pour l'instant hasardeux de vouloir interpréter de tels résultats sous l'angle de la structure secondaire de M-ADN (chaînes d'ADN partiellement monocaténaires ou de sa structure primaire (bases rares ou même nouvelles). L'argument contre une telle tentative d'interprétation est développé dans la partie "Annexe".

6.1.4 Cinétique de renaturation

Position du problème

On sait, d'après les expériences de compétition, que M-ADN isolé par la méthode au Mg^{++} est topologiquement spécifique de la membrane (voir plus loin). Nous aimerions maintenant savoir si M-ADN se distingue du NM-ADN (≅ T-ADN) au point de vue de son "organisation interne". La méthode d'investigation que nous allons utiliser nous permet de poser plus spécifiquement deux questions.

1) M-ADN est fait de combien de familles d'ADN et lesquelles? (répétitives, moyennement répétitives, uniques ; pour revue, voir par exemple Britten et Kohne 1968)
2) Quelles sont les proportions relativesde ces familles (s'il a en a plusieurs) au sein de M-ADN?

a) Cinétique de renaturation de T-ADN avec lui-même

La fig. 26 représente la cinétique de renaturation de T-ADN avec lui-même; on constate qu'environ 11% de l'ADN total contient des séquences hautement répétitives car à des Cot $<2 \times 10^{-3}$ il a déjà renaturé. 25% environ de T-ADN contient des séquences moyennement répétitives (renaturation entre Cot 1×10^{-2} et Cot 7). Le reste soit 64% du génôme total représente des séquences uniques (voir aussi tableau VII).

b) Cinétique de renaturation de ^{32}P M-ADN

La fig. 27 montre la cinétique de renaturation de ^{32}P M-ADN mesurée en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN (1000x). On peut constater que pour des valeurs de Cot $<2 \times 10^{-3}$, 24% de M-ADN ont déjà renaturé (ADN très

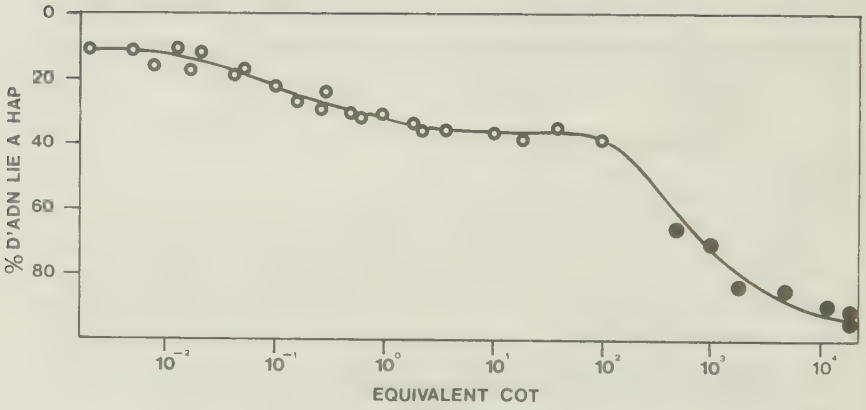


FIG. 26 Cinétique de renaturation de ^{3}H T-ADN seul. Les fragments d'ADN (600-700 bases) ont été renaturés dans 0.12 M PB (O) ou dans 0.7 M P B (●) à 60^{o} ou 73^{o} respectivement. Le degré de renaturation a été mesuré par passage de l'ADN dans des colonnes d'HAP. La renaturation va jusqu'à 94 %.

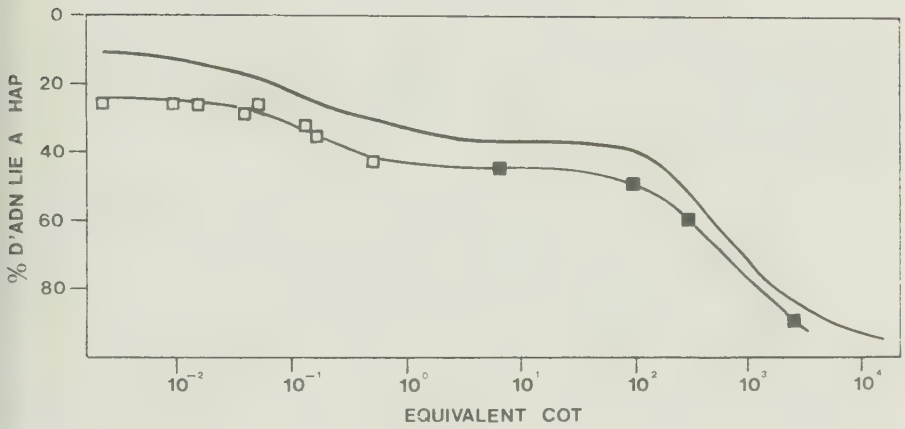


FIG. 27 Cinétique de renaturation de ^{32}P M-ADN en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN (1:1000). La réaction a eu lieu dans 0.12 M PB (□) ou 0.67 M PB (■) à 60^{o} ou 73^{o} respectivement. Le degré de renaturation a été mesuré par passage de l'ADN dans des colonnes d'HAP. Comme rappel, on a dessiné la courbe de renaturation de T-ADN seul de la fig. 26.

répétitif). 21% renature entre Cot 1 x 10^{-2} et 2 (ADN moyennement répétitif). 55% renature à partir de Cot 70 (séquences uniques). Le tableau VII récapitule les résultats obtenus.

Tableau VII

Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans les fig. 26 et 27. Les chiffres indiqués représentent des fractions d'ADN adsorbé à l'HAP. Les fractions sont exprimées en % de l'ADN total élué à 0.12 M PB et à 0.4 M PB, et précipité dans 10% TCA.

	Familles d'ADN		
	Très répét. Cot < 2 x 10^{-3}	Moyennement répét. 1 x 10^{-2} < Cot < 7	Unique Cot > 70
T-ADN seul	11 - 12	25	64
M-ADN	24	21	55
$\frac{\text{M-ADN}}{\text{T-ADN}}$	2.2	0.84	0.86

M-ADN se différencie de T-ADN surtout par sa teneur élevée en séquences répétitives: 24% soit 2.2 fois plus que T-ADN. Cette augmentation se fait au dépend des deux autres familles. Nous sommes donc en mesure de répondre aux questions posées précédemment:
1) M-ADN est fait de 3 familles d'ADN (très répétitives, moyennement répétitives, uniques). Il ne se distinguent pas en cela de T-ADN.
2) Les proportions des familles au sein de M-ADN sont 24% pour les séquences répétitives, 21% pour les moyennement répétitives et 55% pour les séquences uniques.

6.2 Propriétés spécifiques de M-ADN

6.2.1 Evidence pour la spécificité topologique de M-ADN

Il est nécessaire de montrer que l'ADN attaché à la membrane purifiée est bien le même que celui existant in vivo, autrement dit que le M-ADN du complexe isolé est topologiquement spécifique de la membrane nucléaire. Si l'ADN lié à la membrane nucléaire lors de l'isolement du complexe représentait un artéfact d'extraction, c'est-à-dire qu'il résulterait d'un attachement non spécifique à la membrane de l'ADN total pendant l'extraction, on devrait pouvoir le "chasser" ou le diluer par adjonction d'une certaine quantité de NM-ADN aux noyaux dont on veut isoler la m.n.. A une quantité constante de noyaux marqués à la ^{3}H-TdR et à la ^{14}C-choline, on a ajouté des quantités croissantes de NM-ADN non marqué et isolé le complexe par la méthode au Mg^{++}. Le rapport $\frac{^{3}H/^{14}C \text{ membrane}}{^{3}H/^{14}C \text{ total}}$ a été déterminé dans chaque cas (fig. 28). Deux courbes théoriques représentant les cas extrêmes ont été dessinées en partant d'une valeur moyenne des rapport initiaux. La première, (rapport constant) représente la moyenne des valeurs qu'on devrait obtenir si l'ADN lié à la membrane ne peut en aucun cas être chassé. La deuxième (diminution du rapport) représente la moyenne des valeurs si M-ADN se comporte exactement comme le NM-ADN ajouté. La fig. 28 résume les résultats de deux expériences séparées. On voit qu'en fonction de la quantité d'ADN froid ajouté, le rapport ne varie pas de manière significative. La conclusion que l'on en tire est que M-ADN isolé par cette technique n'est pas un artéfact d'extraction, autrement dit que M-ADN du complexe isolé est topologiquement spécifique de la membrane nucléaire.

6.2.2 ADN synthétisé tardivement dans la période S

Des études faites soit par autoradiographie (Williams et Ockey 1970), soit par analyse biochimique (Kay et al. 1971), ont montré que l'ADN synthétisé en fin de période S était situé à proximité de la membrane nucléaire. Il nous a paru intéressant de vérifier ces faits sur nos cellules CHO dont la croissance peut être synchronisée. Les cellules

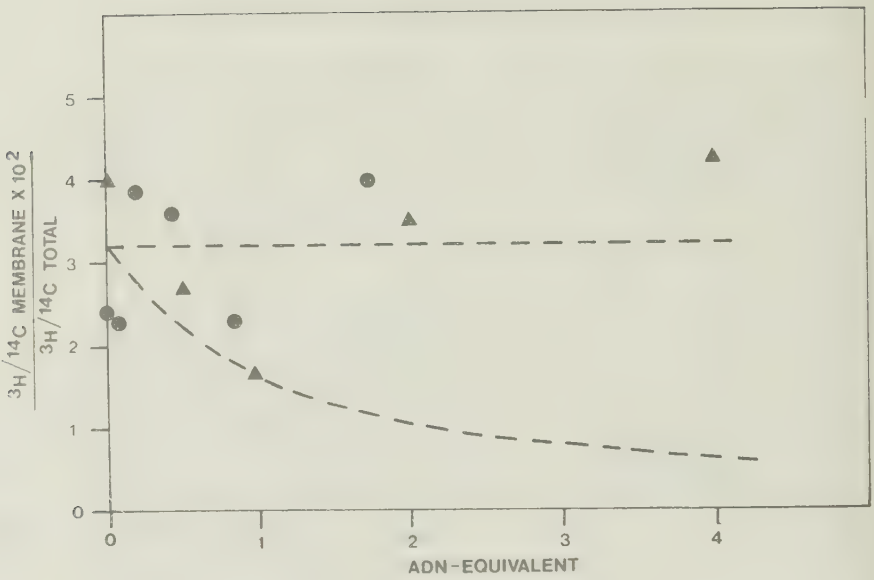
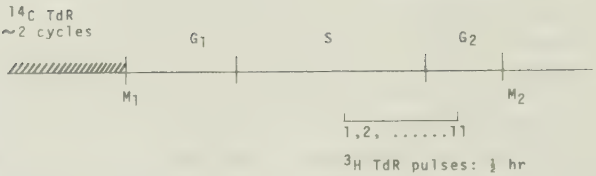


FIG. 28 Détermination de la spécificité topologique de M-ADN : compétition entre NM-ADN et M-ADN. A une quantité constante de noyaux (● : 3.9×10^6 ; ▲ : 2.1×10^6) marqués à la ^3H TdR et à la ^{14}C choline on a ajouté des quantités connues de NM-ADN froid (déterminées par la méthode à la diphénylamine). La m.n. a été isolée par la méthode au Mg^{++} et directement précipitée au TCA 5 % ainsi que le matériel en bas du tube représentant la quasi-totalité de l'ADN. Le rapport $\frac{^3H/^{14}C \text{ m.n.}}{^3H/^{14}C \text{ total}}$ a été déterminé dans chaque cas. 1 ADN-équivalent = 12 µg d'ADN pour(▲), et 23 µg d'ADN pour (●).

mitotiques marquées au préalable pendant 2 cycles à la ^{14}C-TdR ont été préparées puis plantées dans un milieu de croissance non marqué. Elles ont été marquées brièvement avec ^{3}H-TdR à différents temps en cours de phase S (tableau VIII A). Le rapport $^{3}H/^{14}C$ de chaque lot de cellules marquées brièvement a été déterminé de façon à connaître précisément quels lots correspondaient à la fin de la phase S (tableau VIII B). Les lots on ensuite été groupés selon le tableau VIII B (groupes I à V). Les noyaux de chacun de ces groupes ont été isolés. La m.n. des groupes I à V a ensuite été séparée sur gradient, et le rapport $\frac{^{3}H/^{14}C(\text{membrane})}{^{3}H/^{14}C(\text{gradient})}$ a été déterminé pour chaque groupe (tableau VIII C).

Si l'ADN en relation avec la membrane nucléaire était préférentiellement synthétisé en fin de phase S, le rapport $\frac{^{3}H/^{14}C(\text{membrane})}{^{3}H/^{14}C(\text{gradient})}$ devrait augmenter progressivement depuis le groupe I jusqu'au groupe V. En fait, le rapport ne varie pas d'une manière significative. Par conséquent, nous concluons que l'on n'a pas d'ADN synthétisé pendant la fin de la phase S associé d'une manière préférentielle à la membrane nucléaire.

(A)



(B)

	Lot de cellules marquées brièvement										
rapport	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$^{3}H/^{14}C$	22.9	19.9	20.2	18.5	17.3	12.8	13.5	11.0	9.6	10.2	11.0
	I			II		III		IV		V	

(C)

	Rapport $^{3}H/^{14}C$ de l'ADN		$\frac{^{3}H/^{14}C \text{ (memb.)}}{^{3}H/^{14}C \text{ (grad.)}}$
	gradient total	membrane	
I	32.04	29.56	0.92
II	21.61	18.85	0.87
III	14.93	13.08	0.87
IV	8.81	8.32	0.94
V	14.17	13.34	0.94

TABLEAU VIII

ADN synthétisé en fin de phase S : résumé de l'expérience.
A : marquage des cellules. Les cellules CHO en culture asynchrone ont été marquées à la ^{14}C TdR (0.06 µCi/ml + 3.2 µg/ml de TdR non marquée) pendant 2 cycles environ. A M_1, les cellules mitotiques ont été sélectionnées par agitation et cultivées ensuite en lots dans du milieu non marqué. En fin de phase S les lots ont été marqués pendant ½ heure avec ^{3}H TdR (100 µCi/ml).
B : détermination du rapport $^{3}H/^{14}C$ dans les différents lots de cellules. Une aliquote de chaque lot a été prélevée et comptée sur des filtres GF/B après lavage au TCA 5 %. Les lots ayant à peu près les mêmes rapports $^{3}H/^{14}C$ ont été groupés.
C : détermination des rapports $^{3}H/^{14}C$ (gradient) et $^{3}H/^{14}C$(m.n.)après isolement de la m.n. par la technique au Mg^{++}.

DISCUSSION

1. Techniques d'isolement du complexe ADN-m.n.

Le tableau II indique que le pourcentage d'ADN total nucléaire restant attaché à la m.n. est de 1 % dans la méthode à la DNAase, et de 3-5 % dans la méthode au Mg^{++}.Cette différence provient probablement du découpage plus important de l'ADN obtenu avec la DNAase. D'autre part, 5 à 10 % de la radioactivité nucléaire provenant de la choline sont détaché de la membrane dans la méthode à la DNAase alors que ce chiffre est de 20 % dans la méthode au Mg^{++}. Trois causes peuvent expliquer ce détachement. 1) le matériel détaché pourrait être de l'ADN qui a été marqué au ^{14}C par tansfert enzymatique d'un méthyl marqué de la choline sur l'ADN ou sur un précurseur biosynthétique de celui-ci lors du marquage in vivo. 2) la solubilisation de phospholipides de la membrane nucléaire par l'action du milieu environnant . 3) la présence de phospholipides en contact étroit avec l'ADN. Fakan (comm. pers.) note par autoradiographie, après un lavage de cellules P 815 marquées à la ^{3}H choline, la présence de grains localisés à l'intérieur du noyau.

Les deux techniques d'isolement de la m.n. que nous avons utilisées ont plusieurs avantages dont les principaux sont le haut rendement et la préservation de la structure membranaire. D'autres techniques faisant intervenir la sonication des noyaux, réduisent la membrane en petits fragments dont la structure est altérée (Tsukagoshi et Fox 1971). Nous pensons aussi que la matériel isolé par nos méthodes offre un degré de pureté supérieur à celui obtenu par la méthode dite de "M-Band". Skiroki et al. (1974) ont en effet démontré que cette technique était non-spécifique.

2. Propriétés de la membrane nucléaire

La comparaison des profils des constituants protéiques de la membrane nucléaire ou de la chromatine digérée à la DNAase dans des gels de polyacrylamide contenant du SDS (fig. 14) montre que la chromatine pos-

sède proportionnellement plus de protéines de PM < 40 Kd alors que la m.n. possède proportionnellement plus de protéines de PM > 40 Kd. On peut distinguer arbitrairement 4 groupes de protéines dans la m.n. : la protéine du groupe no 1 de PM aux environs de 220 Kd (les évaluations sont moins précises dans cette région du gel, car la relation entre le PM et la distance de migration n'est plus linéaire) pourrait être de la myosine. On a en effet déjà trouvé de la myosine dans des noyaux de Physarum (LeStourgeon 1974). Les protéines du groupe 2 et 3 correspondent dans leur mobilité aux protéines présentes dans la m.n. de foie de rat isolée par deux méthodes différentes (Suria et Liew 1974). Les protéines du groupe 3 et éventuellement 1 sont présentes en gros dans les profils publiés par Berezney et Coffey (1974). La position des protéines du groupe 4 correspond à la position de migration des histones F3 et F2a1, mais nous n'avons pas de preuve formelle sur l'identité de ces deux protéines. Avec cette réserve, le fait de trouver les histones F2a1 et F3 liées à la m.n. après traitement extensif à la DNAase puis lavage dans une solution de force ionique élevée est intéressant, car il suggère un modèle de l'attachement de l'ADN à la m.n.. Le modèle courant d'organisation de la chromatine est celui d'unités identiques d'histones (nucléosomes) arrangées en chapelet le long de l'ADN, chaque unité contenant les tétramères $(F3)_2$ $(F2a1)_2$ et $(F2b)_2$ $(F2a2)_2$ (Olins et Olins 1974 ; Baldwin et al. 1975 ; Oudet et al. 1975 ; Kornberg et Thomas 1974 ; Kornberg 1974). Il est probable que la liaison entre les histones se fait par la partie hydrophobique de la molécule d'histone, la partie ionisée servant de site d'attachement à l'ADN. Le fait que les histones séparées, et aussi les deux sous-unités des nucléosomes, peuvent former des liaisons hydrophobes très stables avec eux-mêmes, suggère que des liaisons du même type seraient possibles entre les régions hydrophobes des histones et des sites membranaires. (Il est connu que les histones peuvent s'attacher à la membrane superficielle de la cellule; Ryser 1967). L'attachement de l'ADN à la membrane nucléaire pourrait se faire par l'intermédiaire de nucléosomes. La fraction hydrophobe du tétramère

$(F2a1)_2$ $(F3)_2$ pourrait être liée directement par des liaisons hydrophobes et hydrogènes à une zone lipoprotéique de la m.n.. La fraction F2a2 et F2b serait dirigée vers l'intérieur du noyau. Dans ce modèle, on peut imaginer de multiple possibilités d'ancrage de l'ADN. Les évidences que nous possédons sur le comportement de la liaison ADN-m.n. face à des forces ioniques élevées, face à de la pronase, à du détergent non ionique, à des agents dénaturants, ainsi que la nature non cryptique de l'ADN lié à la membrane nucléaire indiqueraient un attachement situé sur la périphérie du nucléosome. Cet attachement serait localisé plus précisément vers la région hydrophobe du tétramère $(F2a1)_2(F3)_2$ c'est-à-dire aussi en contact ou à proximité immédiate de l'enveloppe interne de la m.n.. L'affinité de F2a1 et F3 pour l'ADN est connue: Ilyin et al. (1971), ont montré que ces histones étaient les dernières à être extraites de la chromatine. Röwekamp et Sekeris (1974) ont montré par analyse de vitesse de sédimentation que l'ADN de foie de rat avait une grande affinité pour des protéines extraites de la m.n.. Feldherr (1974) a montré l'existence de protéines chargées positivement dans ou sur la m.n..Ch.Ventling (comm. pers.) trouve aussi les histones F2a1 et F3 dans des gels de protéines de la m.n..

La littérature indique des densités de flottaison de la m.n. variant de 1.16 à 1.22 g/cm^3 (Kashnig et Kasper 1969 ; Franke et al. 1970 ; Mizuno et al. 1971a). La présence d'ADN dans la m.n. ne peut être la cause d'une telle variation de densité lors de centrifugation à l'équilibre ; d'autres expériences en effet nous ont montré qu'il n'y avait pas de différence de densité entre de la m.n. contenant encore 1 % de l'ADN nucléaire et de la m.n. ne contenant plus d'ADN. Cette observation confirme les résultats obtenus par Franke et al. (1973). Nous pensons plutôt que ces variations de densités sont dues à la force ionique présente dans le gradient et aussi à la nature des ions présents.

Le profil de l'ADN dans la région de la m.n. centrifugée à l'équilibre dans un gradient de saccharose (fig. 17) traduit un détachement de l'ADN de la m.n.. Ce détachement peut être dû soit à la présence d'ADN contaminant (= NM-ADN) isolé en même temps que la m.n.,

soit à la destabilisation de la liaison ADN-m.n., ou soit encore à la désagrégation de la m.n. par le cation Mg^{++}spécifiquement. La présence d'ADN contaminant (= NM-ADN) est peu probable ; ceci est démontré par le fait que l'ADN présent dans le complexe ne peut pas être chassé par NM-ADN (voir résultats). La nature ionique de la liaison ADN-m.n. est exclue par les évidences expérimentales du chapitre 5, où l'on a montré que la liaison entre l'ADN et la m.n. était stable en présence de concentrations de NaCl aussi élevées que 2 M. La désagrégation de la m.n. nous semble être la cause la plus probable. Cette hypothèse est supportée par le résultat de l'expérience suivante : le complexe marqué à la ^{14}C choline et à la ^{3}H TdR a été extrait par la technique au Mg^{++}. Une partie a été stockée en solution à -20^{o} pendant 4 jours puis sédimentée sur un coussin de saccharose, et l'autre a été sédimentée immédiatement sur coussin de saccharose. Il apparaît que dans le premier cas le détachement de l'ADN de la m.n. est complet : plus aucune radioactivité est détectable dans la membrane. Dans le second cas, 73 % seulement de l'ADN s'est détaché. D'autre part, le profil des protéines de la m.n. isolée par la méthode au Mg^{++} dans des gels de polyacrylamide révèle beaucoup moins d'histones F3 et F2a1 que dans le cas de la m.n. isolée par la méthode à la DNAase 1 (résultats non montrés).

3 Détachement de l'ADN de la m.n.

86 % de l'ADN de la m.n. isolé par la méthode à la DNAase 1 peut être hydrolysé par une deuxième digestion à la DNAase 1. Les 14 % restants ne sont en fait plus attachés à la m.n. (fig. 18,19). La quantité d'ADN toujours lié à la m.n. selon nos estimations (voir p. 66) ne doit pas dépasser 0.005 % de l'ADN total nucléaire. Nous avons conclu à la nature non cryptique de l'ADN lié à la m.n.. Nos résultats paraissent être en contradiction avec ceux publiés par Kay et al. (1972) et Franke et al. (1973). Franke et al. (1973) trouvent après digestion de la m.n. de foie de rat à la DNAase 1 pendant 3 heures, 60 % d'ADN hydrolysé par unité de lipide ; après lavage par flottaison ils trouvent encore 0.15 à 0.35 % (poids sec) d'ADN

toujours attaché à la membrane. Il est important de savoir si en fait ces 0.15 à 0.35 % d'ADN ne représentent pas du matériel membranaire car Schneider et Greco (1971) et Goldspink et Goldberg (1973) ont démontré que le ^{3}H de ^{3}H TdR pouvait être incorporé en particulier dans des phospholipides chez le rat. Malheureusement Franke ne précise pas si les mesures d'ADN ont été faites par la méthode à la diphénylamine ou par mesure de la radioactivité due à la ^{3}H TdR. En ce qui nous concerne, la possibilité d'un marquage de la membrane par la ^{3}H TdR peut être exclu car on n'observe pas de pic dû à ^{3}H dans la zone de la membrane après digestion à la DNAase 1 (fig 19).

Le tableau IV et la fig 22 montrent le comportement de M-ADN vis-à-vis de forces ioniques variables et d'agents dénaturants. Concernant l'action de NaCl, notre conclusion est que la liaison d'ADN est stable face à des forces ioniques élevées, ceci entre 4^{o} et 34^{o} . Cette conclusion confirme celles d'Ormerod et Lehmann (1971), de Franke et al. (1973) et de Kubinski et al. (1972). Ces chercheurs ont soumis la m.n. à des centrifugations dans des solutions de CsCl (jusqu'à 4 M); bien que Franke note un certain détachement de l'ADN dû selon lui à la présence d'ADN contaminant, tous sont d'accord pour dire qu'il existe une fraction d'ADN dont la liaison à la membrane est résistante à l'action de la force ionique. Nos résultats montrent que des agents dénaturants destabilisent la liaison en partie : environ 40 % de l'ADN par unité de membrane est relâché dans les deux cas. Dans le cas de la formamide pourtant, on note une augmentation apparente de la liaison à partir de 50 % environ de FA, pour aboutir à 2.7 fois plus d'ADN lié à la membrane par rapport un contrôle en présence de 80 % de FA. L' ADN dans ces conditions (80 % de FA, 0.5 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 7.4, 22^{o}) est probablement sous forme dénaturée (Burton et Sinsheimer 1965), et il est connu (Fakan et al. 1972 ; Kubinsky et al. 1972) que sous cette forme il peut se lier à des membranes d'une manière non spécifique. Franke et al. (1973) note aucun changement dans l'association ADN-membrane en présence de 5.5 M urée. Il faut aussi mentionner que lors des traitements du complexe ADN-m.n. par NaCl ou des agents dénaturants, nous avons noté une solubilisation de la m.n.. Cette

solubilisation va en augmentant avec la concentration de réactifs utilisés : 6 0 % de la m.n. est solubilisé dans 8 M urée, 50 % est solubilisé dans 80 % de FA.
Lorsqu'on traite la membrane avec un détergent non ionique (NP 40) ou avec la pronase, on note un détachement de l'ADN (fig. 23 et tableau V). Nous avons conclu à la nature lipoprotéique de terrain d'attachement pour une partie de l'ADN.Cependant, après ces traitements, une partie de la membrane se trouve dans le culot et semble avoir une densité d'au moins 1.5 g/cm^3 dans un gradient de CsCl (résultats non montrés). Il est possible que ce matériel représente des régions de la membrane, résistantes à la pronase et au NP 40, mais toujours attachées à l'ADN. Des études plus détaillées sont nécessaires pour clarifier ce point.

4 Enrichissement en séquences répétitives de M-ADN

La plupart des micrographies de cellules interphasiques montrent qu'une partie de la chromatine condensée est en contact avec la membrane nucléaire, (Franke 1974 ; fig. 1 et 2) et aussi avec la région nucléolaire (Schildkraut et Maio 1968 ; Mattoccia et Comings 1971). Beaucoup de chercheurs ont étudié la nature de l'ADN présent dans cette chromatine condensée (pour revue, voir Yunis et Yasmineh 1971). Mattoccia et Comings (1971) et Yasmineh et Yunis (1970) ont isolé par centrifugation différentielle de la chromatine, des fractions qui sont censées représenter l'hétérochromatine (= chromatine condensée) et l'euchromatine (= chromatine dispersée) de foie de souris. Ils ont montré que l'hétérochromatine est plus riche en AT (= ADN satellite) que l'euchromatine. L' ARN transcrit in vitro de la fraction riche en AT (ADN satellite) de l'ADN total s'hybridise in situ préférentiellement dans des blocs d'hétérochromatine associés à la m.n. et particulièrement vers la région nucléolaire (Rae et Franke 1972).

Le profil de M-ADN dans des gradients de CsCl (fig. 24) montre que dans notre cas M-ADN est enrichi 2.4 fois en ADN satellite par rapport à de l'ADN total. La même fig. montre aussi que le M-ADN est hétérogène au point de vue famille de séquences. Cette observation favorise

par conséquent (mais ne prouve pas) l'idée que M-ADN peut contenir des séquences uniques ou moyennement répétitives. Les résultats obtenus lors des expériences de renaturation de M-ADN confirment cette hypothèse.

Les expériences de renaturation nous montrent que l'ADN total est composé de 3 familles d'ADN : très répétitif, moyennement répétitif et unique, représentant 11 %, 25 %, 64 % repectivement de l'ADN total (tableau VII et fig. 26). Ces trois familles principales d'ADN ont été trouvées dans beaucoup d'eucaryotes (Britten et Kohne 1968). Les proportionsdes trois familles que nous trouvons correspondent assez bien avec les résultats fournis par la littérature, par exemple 9 %, 19 %, 65 % pour le rat (Holmes et Bonner 1974) et 10 %, 20 %, 70 % pour la souris (Waring et Britten 1966) ; Britten et Kohne 1968). Notre proportion d'ADN très répétitif (11-12 %) est légèrement supérieure à ces derniers chiffres (9-10 %). Ceci peut être dû à un marquage préférentiel de cette famille d'ADN par ^{3}H TdR, car elle est enrichie en AT ; les résultats mentionnés par les auteurs ci-dessus ont été obtenus sur HAP et les mesures ont été faites par photométrie. La courbe de renaturation de ^{32}P M-ADN en présence d'un excès de ^{3}H T-ADN nous montre que M-ADN est constitué par les mêmes 3 familles d'ADN qu'on trouve dans T-ADN (fig. 27, tableau VII). Cependant, on constate que 24 % de M-ADN ont déjà renaturé à Cot < 2×10^{-3}. Cette fraction représente de l'ADN hautement répétitif. En comparant ces 24 % mesurés dans M-ADN aux 11 % d'ADN très répétitif mesurés dans T-ADN, on trouve que M-ADN est enrichi en séquences très répétitives par un facteur de 24/11 = 2.2 fois. Si l'on corrige ce résultat par un facteur de 11/10 (pour tenir compte de la surévaluation des séquences répétitives du T-ADN due au marquage préférentiel par ^{3}H TdR (voir plus haut) on arrive au chiffre de 2.4. Ces résultats confirment nos observations faites sur gradient de CsCl (fig. 24). Ils confirment aussi les résultats de Franke et al. (1973) qui, par différentes techniques de mesure (CsCl, variation de l'hypochromicité, fractionnement sur HAP), calculent un facteur d'enrichissement de 1.40 environ. Il faut enfin noter que nos résultats sur l'enrichissement des séquences répétitives

dans M-ADN peuvent être sous-estimés, même en tenant compte du marquage préférentiel des séquences riches en AT par ^{3}H TdR. Schildkraut et Maio (1968), Mattoccia et Comings (1971) ont remarqué un net enrichissement de l'ADN satellite dans la région nucléolaire. Cet ADN est très fortement lié à ces structures (résistant jusqu'à 2 M NaCl selon Schildkraut). Lors de l'isolement de la m.n. par la technique au Mg^{++} nous excluons la possibilité de contamination de la m.n. par des nucléoles en faisant migrer celle-ci de bas en haut et il se peut très bien que nous perdions là une partie de l'ADN très répétitif.

5 Présence d'ADN monocaténaire dans la m.n.

La possibilité de l'existence de régions monocaténaires dans l'ADN de la m.n. (Mizuno et al. 1971b)a été examinée par taitement de M-ADN à la nucléase S1, enzyme qui dégrade spécifiquement l'ADN monocaténaire. Les résultats (fig. 25) montrent qu'à la sensibilité près de la technique il n'existe pas d'ADN monocaténaire dans la m.n.. Cependant il convient de faire des restrictions en ce qui concerne la sensibilité de la méthode. La précipitation d'ADN plus importante que dans le contrôle lors d'incubation de la membrane avec S1 et les détergents peut s'expliquer si l'on admet qu'il y a eu une agrégation de l'ADN avec la m.n. lors de l'incubation. Kay et al. (1972) notent aussi ce phénomène lors de digestion d'ADN par la DNAase 1. Cela implique que nous n'avons pas précipité tout l'ADN du contrôle ; nous ne pensons pas que cela porte à conséquence sur le résultat négatif de cette expérience. Nos résultats confirment ceux obtenus par Franke et al. (1973) qui par observation d'ADN de membrane au ME ne trouvent pas de structures typiques d'ADN monocaténaires.

6 Evidence pour la spécificité de l'ADN lié à la membrane.

Le fait que (fig. 28) l'ADN en relation avec la m.n. in vivo ne peut être chassé par de l'ADN non membranaire (= NM-ADN) n'est pas suffisant en lui-même pour affirmer que M-ADN possède des sites d'attachement absolument spécifiques à la m.n.. On peut imaginer que certaines séquences ayant une affinité pour la membrane nucléaire sont présentes en concentrations beaucoup plus élevées dans M-ADN que dans NM-ADN.

Nous avons conclu que l'ADN attaché à la m.n. de cellules CHO n'est pas synthétisé préférentiellement en fin de phase S (tableau VIII). Ces résultats confirment ceux obtenus par Comings et Mattoccia (1970) qui, sur des CHO, montrent par cinétique de renaturation que l'ADN synthétisé tôt dans la phase S ne se distingue pas de celui synthétisé en fin de phase S. De même, Amaldi et al.(1973) montrent, sur des CHO, par autoradiographie de fibres d'ADN que la séquence dans le temps de l'initiation des réplicons n'est pas reproductible de cycle en cycle. Cependant, nos résultats sont en contradiction avec ceux présentés par Franke et al.(1973) ainsi que Kay et al. (1971). Ces auteurs ont mesuré l'activité spécifique de l'ADN lié à la m.n. après des marquages relativement courts (12 à 45 min.) à la ^{3}H TdR dans des foies de rat partiellement hépatectomisés, pendant un cycle quasi-synchrone de synthèse de l'ADN.Les deux trouvent une augmentation du rapport des activités spécifiques de l'ADN lié à m.n./ADN total,en fin de phase S. Cette divergence entre nos résultats et les résultats de ces auteurs peut simplement être due au fait que l'organisation de la réplication du génôme des cellules CHO est différente de celle de cellules de rat. La littérature rapporte, en effet, une grande diversité de séquences de réplication de l'ADN durant la phase S. Bostock et Prescott (1971), par exemple, rapportent que sur des cellules L de souris les séquences riches en AT de l'ADN satellite sont synthétisées pour la plupart pendant le 3 ème quart de la phase S ; Tobia et al. (1970) ont montré, par marquages brefs de cellules HeLa maintenues en culture synchrone, que l'ADN ayant une densité de flottaison faible dans des gradients de CsCl (= ADN riche en AT) était synthétisé préférentiellement en fin de phase S. Il faut enfin mentionner les travaux d'Huberman et al. (1973) et de Williams et Ockey (1970) qui ont montré, par autoradiographie, que l'ADN synthétisé en fin de phase S se trouve dans la région périphérique hétérochromatique du noyau. Nos résultats ne sont pas en contradiction avec ceux de ces auteurs ; ils ne sont simplement pas directement comparables pour des raisons quantitative et topologique. En effet, nous étudions seulement la réplication d'une portion d'ADN représentant 1 % environ de l'ADN total qui est localisé immédiatement à

proximité de la m.n., alors que ceux-ci étudient la réplication de 30 à 40 % de l'ADN total situé dans une zone comprise entre la m.n. et 1.25 µm en deçà.

CONCLUSION

Le travail présenté ici a été centré sur l'étude morphologique et biochimique du complexe ADN chromosomique-m.n. chez des cellules de mastocytome de souris de la lignée P 815 et chez des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO). Nous tirons des résultats obtenus les conclusions suivantes :

1. Il existe une fraction d'ADN chromosomique total qui reste lié à la membrane nucléaire après isolement de celle-ci par deux techniques différentes.

2. Cet ADN est topologiquement spécifique de la m.n..Son attachement à la m.n. ne résulte pas d'une redistribution de la NM-chromatine lors de l'isolement de la m.n..

3. Sur des cellules CHO, l'ADN lié à la m.n. n'est pas synthétisé préférentiellement en fin de la phase S.

4. La liaison de l'ADN à la m.n. est superficielle : $\geqslant$ 99.5 % de l'ADN isolé avec la m.n. n'est pas ancré dans la masse membranaire.

5. La liaison entre l'ADN et la m.n. n'est pas du type ionique mais plutôt du type hydrophobe et hydrogène.

6. Les histones F3 et F2a1 sont présentes dans le complexe ADN-m.n. en quantité à peu près équimolaire.

7. M-ADN n'est pas monocaténaire. Il n'est pas hydrolysé par la nucléase S1.

8. L'ADN isolé avec la m.n. est constitué de 3 familles d'ADN : ADN très répétitif, ADN moyennement répétitif, ADN unique. Il ne se distingue pas en cela de l'ADN total.

9. L'ADN isolé avec la m.n. contient relativement 2.4 fois plus d'ADN très répétitif que l'ADN total.

Ces résultats nous permettent de proposer un modèle décrivant la liaison de l'ADN à la m.n.. Ce modèle suggère que la liaison de l'ADN à la m.n. se fait par l'intermédiaire de nucléosomes. Les sous-unités F3 et F2a1 des nucléosomes sont liées par leur fraction hydrophobe à des lipoprotéines contenues dans la m.n.. Une certaine fraction de l'ADN isolé avec la m.n. est prise en sandwich entre les histones F3 et F2a1 et la m.n. ou est liée à la fraction hydrophobique de F3 et F2a1.

REFERENCES

1. Aaronson R.P., Blobel G., J. Cell Biol. 62, 746 (1974)
2. Allin E.P., Montagnier L., Biochimie 55 317 (1973)
3. Agutter P.S., Biochim.Biophys.Acta 255 397 (1972)
4. Amaldi F., Buongiorno-Nardelli M., Carnevali F., Leoni L., Mariotti D., Pomponi M., Exptl Cell Res 80 79 (1973)
5. Baldwin J.P., Boseley P.G., Bradbury E.M., Ibel K., Nature 253 245 (1975)
6. Barton A.D., Kisielesky W.E., Wassermann F., Mackevicius F., Z. Zellforsch. 115 299 (1971)
7. Berezney R., Coffey D.S., Biochem. Biophys. Res. Commun. 60 1410 (1974)
8. Bergeron J.J.M., Warmsley A.M.H., Pasternak C.A., Biochem.J. 119 489 (1970)
9. Blobel G., Potter Van R., Science 154 1662 (1966)
10. Bornens M., Nature 244 28 (1973)
11. Bostock C.J., Prescott D.M., Exptl Cell Res 64 267 (1971)
12. Brammer K.W., Biochim. Biophys. Acta 72 217 (1963)
13. Britten R.J., Kohne D.E., Science 161 529 (1968)
14. Britten R.J., Smith J. Carnegie Institution Year Book 68 p. 378 (1970)
15. Britten R.J., Graham D.E., Neufeld B.R., Methods in Enzymology XXIV Part E p. 363 Acad.Press (1974)
16. Burrell A.D., Feldschreiber P., Dean C.J. Biochim. Biophys. Acta 247 38 (1971)
17. Burton A., Sinsheimer R.L., J.Mol. Biol. 14 327 (1965)
18. Cogliati R., Gautier A., C.R.Acad. Sc. Paris Série D 3041 (1973)
19. Comings D.E., Okada T.A., Exptl Cell Res 62 293 (1970 a)
20. Comings D.E., Okada T.A., Exptl Cell Res 63 62 (1970 b)
21. Comings D.E., Kakefuda T., J. Mol. Biol. 33 225 (1968)
22. Comings D.E., Mattoccia E., Proc. N.A.S. 67 448 (1970)

23. Commerford S.L., Biochemistry 10 1993 (1971)
24. Delius H., Worcel A. J. Mol. Biol. 82 107 (1974)
25. De Lucia P., Cairns J. Nature 224 1164 (1969)
26. Deumling B., Franke W.W., Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 353 287 (1972)
27. Dewey W.C., Miller H.H. Exptl Cell Res 57 63 (1969)
28. Dunn T.B., Potter M. J. Nat. Cancer Inst. 18 587 (1957)
29. Eagle H. Science 130 432 (1959)
30. Earhart C.F., Tremblay G.Y., Daniels M.J., Schaechter M. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33 707 (1968)
31. Edenberg H.J., Huberman J.A. sous presse (1975)
32. Engelhardt P., Pusa K. Nature New Biol. 240 163 (1972)
33. Fakan S., Hancock R., Exptl Cell Res 83 95 (1974)
34. Fakan S., Turner G.N., Pagano J.S., Hancock R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 2300 (1972)
35. Feldherr C.M. Exptl Cell Res 85 271 (1974)
36. Fielding P., Fox C.F. Biochem. Biophys. Res.Commun. 41 157 (1970)
37. Flamm W.G., Bernheim N.J., Brubaker P. E. Exptl Cell Res 64 97 (1971)
38. Franke W.W., Z.Zellforsch. 105 405 (1970)
39. Franke W.W., Int. Rev. Cyt. Suppl. p. 71 (1974)
40. Franke W.W., Deumling B., Zentgraf H., Falk H., Rae P.M.M. Exptl Cell Res 81 365 (1973)
41. Franke W.W., Deumling B., Ermen B., Jarasch E.-D., Kleinig H., J.Cell Biol. 46 379 (1970)
42. Fuchs E., Hanawalt P. J.Mol. Biol. 52 301 (1970)
43. Ganesan A.T., Lederberg J. Biochem. Biophys. Res.Commun. 18 824 (1965)
44. Gefter M.L., Hirota Y., Kornberg T., Wechsler J.A., Barnoux C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 3150 (1971)
45. Glaser M., Bayer W.H., Bell R.M., Vagelos P.R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 385 (1973)
46. Goldspink D.F., Goldberg A.L., Biochim. Biophys. Acta 299 521 (1973)

47. Green M.H., J. Virol. 10 32 (1972)
48. Gross J., Gross M., Nature 224 1166 (1969)
49. Hanaoka F., Yamada M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 647 (1971)
50. Hiby W., Kröger H., J.Chromatography 26 545 (1967)
51. Holmes D.S., Bonner J., Biochemistry 13 841 (1974)
52. Huberman J.A., Tsai A., Deich R.A., Nature 241 32 (1973)
53. Hymer W.C., Kuff E.L., J. Histochem. 12 359 (1964)
54. Ilyin Y.V., Varshavsky A.Y., Mickelsaar U.N., Georgiev G.P., Eur. J. Biochem. 22 235 (1971)
55. Jackson V., Earnhardt J., Chalkley R., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 253 (1968)
56. Jacob F., Brenner S., Cuzin F., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28 329 (1963)
57. Kartenbeck J., Zentgraf H.W.,Scheer U., Franke W.W., Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch. 45 1 (1971)
58. Kashnig D.M., Kasper C.B., J. Biol. Chem. 244 3786 (1969)
59. Kay R.R., Fraser D., Johnston I.R., Eur. J. Biochem. 30 145 (1972)
60. Kay R.R., Haines M.E., Johnston I.R., Febs letters 16 233 (1971)
61. Kennedy E.P., Feder. Proc. 20 934 (1961)
62. Kiefer G., Kiefer R., Sandritter W., Verh. Deut. Ges. Pathol. 55 621 (1971)
63. Kirby K.S., Biochim. Biophys. Acta 36 117 (1959)
64. Kleinig H., Zentgraf H., Comes P., Stadler J., J. Biol. Chem. 246 2996 (1971)
65. Knippers R., Nature 228 1050 (1970)
66. Knippers R., Strätling W., Nature 226 713 (1970)
67. Kornberg T., Gefter M.L. Proc.Nat. Acad. Sci. USA 68 761 (1971)
68. Kornberg T., Gefter M.L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 1348 (1970)
69. Kornberg R.D., Thomas J.O., Science 184 865 (1974)
70. Kornberg R.D., Science 184 868 (1974)
71. Kubai D.F., Ris H., J. Cell Biol. 40 508 (1969)
72. Kubinski H., Gibbs P., Kasper C.B., Biochim. Biophys. Acta 281 244 (1972)

73. Kuno H., Kihara H.K., Nature 215 974 (1967)
74. Kuroiwa T., Exptl Cell Res. 83 387 (1974)
75. Kuroiwa T., Chromosoma 44 291 (1973)
76. Laemmli U.K., Favre M. ., J. Mol. Biol. 80 575 (1973)
77. Lemarchal P., Bornens M., Bull. Soc. Chim. Biol. 51 1021 (1969)
78. LeStourgeon W.M., J. Cell Biol. 63 191a (1974)
79. Loos L.J., Tessler P.M., Salivar W.O., Virology 45 339 (1971)
80. Maizel J.V., Methods in Virology Volume V, p. 179 Academic Press (1971)
81. Marmur J., J. Mol. Biol. 5 109 (1962)
82. Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol. 3 585 (1961)
83. Marvin D.A., Nature 219 485 (1968)
84. Mattoccia E., Comings D.E., Nature New Biol. 229 175 (1971)
85. Mizuno N.S., Stoops C.E., Sinha A.A., Nature New Biol. 229 22 (1971a)
86. Mizuno N.S., Stoops C.E., Peiffer R.L., J. Mol. Biol. 59 517 (1971b)
87. Monneron A., Blobel G., Palade G.E., J. Cell Biol. 55 104 (1972)
88. Moses M.J., Wilson M.H., Chromosoma 30 373 (1970)
89. Nagasawa H., Dewey W.C., J. Cell. Physiol. 80 89 (1972)
90. Nüsslein V., Otto B., Bonhoeffer F., Schaller H., Nature New Biol. 234 285 (1971)
91. Olins A.L., Olins D.E., Science 183 330 (1974)
92. Oppenheim A., Wahrman J., Exptl Cell Res. 79 287 (1973)
93. Ormerod M.G., Lehmann A.R., Biochim. Biophys. Acta 228 331 (1971)
94. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P., Cell 4 281 (1975)
95. Parker D.L. Glaser D.A., J. Mol. Biol. 87 153 (1974)
96. Pasternak C.A., Bergeron J.J.M., Biochem. J. 119 473 (1970)
97. Pearson G.D.,Hanawalt P.C., J. Mol. Biol. 62 65 (1971)
98. Penman S., J. Mol. Biol. 17 117 (1966)
99. Plagemann P.G.W., Arch. Biochem. Biophys. 128 70 (1968)
100. Rae P.M.M., Franke W.W., Chromosoma 39 443 (1972)
101. Reddy G.V.R., Goulian M., Hendler S.S., Nature New Biol. 234 286

102. Rosenberg B.H., Cavalieri L.F., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33 65 (1968)
103. Röwekamp W., Sekeris C.E., Arch. Biochem. Biophys. 160 156 (1974)
104. Ryser H.J.P., Nature 215 934 (1967)
105. Ryter A.,Jacob F., C.R. Acad. Sci. 257 3060 (1963)
106. Ryter A., Bacteriol. Rev. 32 39 (1968)
107. Sakaki Y., Mizuno S., Maruo B., Biochim. Biophys. Acta 232 14 (1971)
108. Schaller H., Otto B., Nüsslein V., Huf J.,Herrmann R., Bonhoeffer F., J. Mol. Biol. 63 183 (1972)
109. Schildkraut C.L., Maio J.J., Biochim. Biophys. Acta 161 76 (1968)
110. Schindler R., Day M., Fischer G.A., Cancer research 19 47 (1959)
111. Schneider W.C., Greco A.E., Biochim. Biophys. Acta 228 610 (1971)
112. Shapiro B.M., Siccardi A.G., Hirota Y., Jacob F., J. Mol. Biol. 52 75 (1970)
113. Sharp P.A., Petterson U., Sambrook J., J. Mol. Biol. 86 709 (1974)
114. Shatkin A.J., Fund. Techn. in Virol. p.496 Academic Press (1969)
115. Shiroki K., Shimojo H., Yamaguchi K., Virology 60 192 (1974)
116. Siccardi A.G., Shapiro B.M., Hirota Y., Jacob F., J. Mol. Biol. 56 475 (1971)
117. Simmons T., Heywood P., Hodge L.D., J. Mol. Biol. 89 423 (1974)
118. Sinsheimer R.L., Knippers R., Komano T., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33 443 (1968)
119. Smith J.D., Methods in Enzymology Vol XII, Part A, p. 350, Academic Press (1967)
120. Smith D.W., Hanawalt P.C., Biochim. Biophys. Acta 149 519 (1967)
121. Smith D.W., Schaller H.E., Bonhöffer F.J., Nature 226 711 (1970)
122. Strätling W., Knippers R., Eur. J. Biochem. 20 330 (1971)
123. Studier F.W., J. Mol. Biol. 11 373 (1965)
124. Sueoka N., Quinn W.G., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 33 695 (1968)
125. Sundler R., Åkesson B., Biochem. J. 146 309 (1975)
126. Suria D., Liew C.C., Biochem. J. 137 355 (1974)

127. Tata J.R., Hamilton M.J., Cole R.D., J.Mol. Biol. 67 231 (1972)
128. Tjio J.H., Puck T.T., J. Exptl. Med. 108 259 (1958)
129. Tobey R.A., Anderson E.C., Peterson D.F., J. Cell. Physiol. 70 63 (1967)
130. Tobia A.M., Schildkraut C.L., Maio J.J., J. Mol. Biol. 54 499 (1970)
131. Trembley G.Y., Daniels M.J., Schaechter M., J. Mol. Biol. 40 65 (1969)
132. Tsukagoshi N., Fox C.F., Biochemistry 10 3309 (1971)
133. Vogt V.M., Eur.J. Biochem. 33 192 (1973)
134. Waring M., Britten R.J., Science 154 791 (1966)
135. Watson M.L., J. Biophys. Biochem. Cytol. 1 257 (1955)
136. Wetmur J.G., Davidson N., J. Mol. Biol. 31 359 (1968)
137. Williams C.A., Ockey C.H., Exptl. Cell Res. 63 365 (1970)
138. Wise G.E., Prescott D.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 714 (1973)
139. Wojtczak L., Baranska J., Zborowski J., Drahota Z., Biochim. Biophys. Acta 249 41 (1971)
140. Yamaguchi K., Murakami S., Yoshikawa H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 1559 (1971)
141. Yasmineh W.G., Yunis J.J., Exptl. Cell Res. 59 69 (1970)
142. Yu C.T., Zamecnik P.C., Biochim. Biophys. Acta 76 209 (1963)
143. Yunis J.J., Human Chromosome Methodology XVIII Academic Press (1965)
144. Yunis J.J., Yasmineh W.G., Science 174 1200 (1971)
145. Zbarsky I.B., Perevoshchikova K.A., Delektorskaya L.N., Delektorsky V.V., Nature 221 257 (1969)